



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE FOSFATOS EN AGUAS
RESIDUALES DOMÉSTICAS UTILIZANDO *Chlorella sp.***

Alcira María Cepeda Domínguez.

Angie Durley Valera Alarcón.

Ingeniería Ambiental

**PROGRAMA DE INGENIERÍA AMBIENTAL
CORPORACIÓN UNIVERSIDAD DE LA COSTA CUC.**

Octubre de 2016, Barranquilla; Colombia

**Evaluación de la capacidad de remoción de fosfatos en aguas residuales domésticas
utilizando *Chlorella sp.***

Alcira María Cepeda Domínguez

Angie Durley Valera Alarcón

Trabajo de grado para obtener el título de:

Ingeniero Ambiental

Tutores

Euler Gallego Cartagena

Msc. en Ciencias Ambientales

Margarita Castillo Ramírez

Msc. en Ingeniería Ambiental

Corporación Universidad de la Costa

Facultad de Ciencias Ambientales

Programa de Ingeniería Ambiental

Barranquilla

2016

Nota de Aceptación.

JURADO.

JURADO.

BARRANQUILLA, OCTUBRE DE 2016.

Agradecimientos

En principio, agradecidas con el Creador, que a través de su diseño perfecto permite asombrarnos de la capacidad y el potencial de toda su obra, y que a través de las facultades otorgadas a nosotros como seres racionales nos concede a diario la oportunidad de maravillarnos con nuevos descubrimientos. Gracias por darnos la sabiduría, fortaleza y paciencia, necesarias para conseguir las metas propuestas y culminar esta etapa tan importante de nuestras vidas.

Gracias a los tutores Euler Gallego y Margarita Castillo, que nos tuvieron en cuenta y brindaron su valioso tiempo y conocimientos, a lo largo de este proceso.

A Erika Acosta, por su tiempo, paciencia e interés. Gracias por hacer cálida cada hora pasada en el laboratorio.

Agradecimiento a mis padres, Martín y Sonia, que siempre estuvo apoyándome en cada instante, para continuar y no desistir hasta llegar al final.

A mis hermanas Daisy y Natacha, por siempre estar ahí.

Gracias a mis hermanos y amigos que, en los momentos de estrés y desánimos, estuvieron atentos a escuchar y brindarme los consejos acertados para cada ocasión. Y, por sus valiosas oraciones, gracias.

Gracias a la Corporación Universidad de la Costa y, de manera especial, al Doctor Mario Maury, por su programa de Becas Talento, que me brindó la oportunidad de estudiar este pregrado.

Angie Valera

Gracias a un par de seres maravillosos, Miguel y Alcira, quienes con sus consejos y amor me han apoyado desde el primer día de mi vida, y me enseñaron que la perseverancia hace frente a cualquier reto.

A mi familia, el pilar que me permite estar en pie frente a cualquier “ocurrencia” que se le antoje a la vida.

Al equipo de Ciencias Ambientales de la Universidad de la Costa, por su apoyo, conocimientos, interés y sobre todo, la experiencia, que nos fueron brindados en el desarrollo del presente proyecto.

Y por último, a la persona en el espejo, quien me mostró la fortaleza de mi interior y la grandeza de mis logros. Gracias.

Alcira Cepeda

Contenido

	pág.
Introducción	13
1. Planteamiento del Problema	15
2. Objetivos.....	18
2.1. Objetivo General.....	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. Justificación	19
4. Marco Teórico y Estado del Arte	22
4.1. Antecedentes	22
4.2. Marco conceptual.....	25
4.2.1. Generalidades de la especie <i>Chlorella sp.</i>	25
4.2.2. Medios de cultivo	26
4.2.3. Parámetros de cultivo	26
4.2.4. Crecimiento Microbiano.	27
4.2.6. Técnica de aislamiento.....	30
4.2.7. Fosfatos en el agua residual	31
4.3. Marco legal	32
5. Metodología.....	33

5.1. Tipo de investigación.....	33
5.2. Lugar de estudio.....	33
5.3. Población y muestra.....	33
5.4. Diseño de investigación	34
5.4.1. Preparación del medio de cultivo «stock».....	34
5.4.2. Obtención de agua residual	38
5.4.3. Preparación del agua residual para los bioensayos.	39
5.4.4. Diseño experimental.....	39
5.5. Determinaciones Analíticas de los Bioensayos	41
5.5.1. Monitoreo del crecimiento de cultivo	41
5.5.2. Determinación de las concentraciones de fosfato (PO ₄)	45
5.6. Análisis Estadístico.....	46
6. Resultados y análisis.....	47
6.1. Determinación de los parámetros de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> , en relación al medio de cultivo utilizado.....	47
6.2. Determinación de la concentración de fosfato removido del agua residual doméstica en función del uso de un cultivo de <i>Chlorella sp.</i>	56
6.3. Comparación en la concentración de fosfato removida en el agua residual doméstica en función de los parámetros de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i>	60
7. Conclusión y Recomendaciones.....	63

7.1. Conclusión	63
7.2. Recomendaciones	65
8. Bibliografía.....	67
Anexos.....	78

Lista de Tablas

	pág.
Tabla 1. <i>Composición química del medio BBM.</i>	36
Tabla 2. <i>Parámetros de crecimiento de Chlorella sp., en las fases de crecimiento, experimento preliminar.</i>	51
Tabla 3. <i>Parámetros de crecimiento de Chlorella sp., en las fases de crecimiento.</i>	54
Tabla 4. <i>Concentraciones del ion PO₄ en relación a las MDC de Chlorella sp., durante las fases de crecimiento.</i>	62

Lista de Figuras

	pág.
Figura 1. <i>Esquema que representa la curva típica de crecimiento durante el desarrollo normal de un cultivo.</i>	28
Figura 2. <i>Estructura de las moléculas de clorofila a y clorofila b.</i>	29
Figura 3. <i>Fotografía de células de Chlorella sp.</i>	34
Figura 4. <i>Fotografía de procedimiento de preparación de medio Agar-Agar.</i>	35
Figura 5. <i>Fotografía de procedimiento de rayado en agar Chlorella sp.</i>	37
Figura 6. <i>Fotografía de procedimiento de rayado en agar Chlorella sp.</i>	37
Figura 7. <i>Fotografía de caja de Petri a los 7 días de haber realizado el método de rayado en agar Chlorella sp.</i>	38
Figura 8. <i>Fotografía de proceso de filtración de Agua Residual.</i>	39
Figura 9. <i>Fotografía de Tratamiento de ARF + MA Réplica 2.</i>	40
Figura 10. <i>Fotografía de Tratamiento de ARF Réplica 2.</i>	41
Figura 11. <i>Fotografía de procedimiento de conteo celular.</i>	43
Figura 12. <i>Fotografía de muestra del cultivo de Chlorella sp., en cámara de Neubauer a través del microscopio.</i>	48
Figura 13. <i>Crecimiento de Chlorella sp., en función del tiempo, experimento preliminar.</i>	52
Figura 14. <i>Crecimiento de Chlorella sp., en función del tiempo.</i>	53
Figura 15. <i>Concentración de Clorofila Total, en función del tiempo.</i>	54
Figura 16. <i>Valores de pH, en función del tiempo.</i>	56
Figura 17. <i>Gráfico del modelo ajustado CIT vs PO_4^{3-}.</i>	58

Figura 18. *Comparación de porcentajes de remoción del ion PO_4^{3-} en el Tratamiento de ARF + Microalga y el control, en función del tiempo.*

Lista de Anexos

	pág.
Anexo 1. Esquema general del proceso metodológico del proyecto	78
Anexo 2. Marcha analítica para la determinación de pigmentos cloroplásticos.	79
Anexo 3. Marcha analítica para la determinación de las concentraciones de fosfato (PO_4).	80
Anexo 4. ANOVA CLOROFILA TOTAL vs FOSFATO	81

Introducción

Uno de los fenómenos que se presenta con mayor regularidad y que contribuye en gran medida al deterioro de la calidad del agua es la eutrofización. Éste, es un proceso que consiste en el aumento de nutrientes en los ecosistemas acuáticos, lo que conlleva a la proliferación de comunidades de productores primarios cuya muerte y posterior descomposición ocasionan la disminución del oxígeno disuelto, que es un factor esencial para la supervivencia de todos los organismos acuáticos (Camargo & Alonso, 2007). De estos nutrientes, destacan el nitrógeno y el fósforo, siendo el último el principal factor que contribuye al incremento de la eutrofización de lagos y aguas naturales. De acuerdo a lo anterior, el control de este elemento en sus diferentes formas siendo descargado a las plantas de tratamiento de aguas residuales industriales y municipales, es un factor clave para prevenir la eutrofización de aguas superficiales, teniendo en cuenta, además, que su presencia ocasiona muchos problemas en la calidad del agua, incluyendo el aumento en los costos de purificación, deterioro de su valor recreacional y el posible efecto letal de algas tóxicas en el agua potable.

Generalmente, la remoción de fósforo en los tratamientos de aguas residuales se realiza a través de métodos químicos y biológicos (Ya'e, Li, Zhae, Wei & Feng, 2015). Con respecto a los segundos, una de las tecnologías que destaca es el tratamiento con microalgas teniendo en cuenta su fácil cultivo, efectividad en remoción y la capacidad de adaptación de algunas cepas a condiciones ambientales rigurosas, además de la oportunidad de obtener biomasa como subproducto aprovechable por otros sectores económicos (Abdel-Raouf, Al-Homaidan, Ibraheem, 2012; Ahmad, Khan & Yasar, 2013).

En el presente proyecto, se pretende determinar la capacidad de remoción de fosfato en aguas residuales empleando un cultivo de *Chlorella sp.*, como alternativa para facilitar la eficiencia y sostenibilidad de los procesos convencionales de depuración de aguas residuales utilizados en la actualidad por empresas de servicio público a nivel local.

1. Planteamiento del Problema

Desde una perspectiva global, las actividades antropogénicas han modificado el componente hídrico tanto en cantidad como en calidad, estando la primera relacionada con la escasez y agotamiento del recurso, y la segunda con la contaminación de los cuerpos de agua y fuentes de abastecimiento. Cuando dichas problemáticas llegan hasta el punto de no retorno, rompiendo el equilibrio de los ecosistemas, indudablemente terminan por afectar la calidad de vida de las poblaciones humanas generando implicaciones a nivel económico y social (Björklund *et al.*, 2009). La ONU estima que dos millones de toneladas de aguas residuales domésticas, industriales y agrícolas son vertidas mundialmente cada día, lo que es igual al peso de toda la población humana, 6.8 billones de personas. La cantidad de agua residual producida anualmente, aproximadamente 1500 km^3 , es seis veces la cantidad de agua que existe en la totalidad de ríos en el mundo (Björklund *et al.*, 2009) (2). Dado que las aguas residuales contribuyen con grandes descargas de nutrientes, especialmente fósforo y nitrógeno, la eutrofización se ha convertido en el problema dominante en la degeneración de la calidad del agua (Björklund *et al.*, 2009). Sumado a lo anterior, las plantas de tratamiento convencionales difícilmente remueven los fosfatos (Resolución 427 de 2009).

La eutrofización, como se ha dicho, es una de las principales causas de deterioro de la calidad del agua, restringiendo su uso para actividades como pesca, recreación, industrias y consumo (Fontúrbel, 2005). Es un proceso relacionado con el aumento excesivo de ciertos nutrientes en los ecosistemas acuáticos lénticos, lo que constituye una condición trófica para el incremento desmedido en la densidad de comunidades de fitoplancton (Von Sperling, da Silva Ferreira & Gomes, 2008). Debido a que estas comunidades presentan cortos periodos de vida, al

morir y ser descompuestas, desencadenan una proliferación de bacterias aeróbicas a las que se asocia a la disminución de los niveles de oxígeno disuelto, provocando condiciones hipóxicas que afectan la vida acuática y la calidad ambiental del recurso agua (Sokolnikov, 1999).

La concentración de fosfatos en los cuerpos de agua superficial representa un problema debido a la reproducción de los organismos unicelulares que dependen del fósforo como fuente de alimentación, lo que conlleva a la eutrofización. Los fosfatos se encuentran en solución, en partículas o detritus, o en cuerpos de organismos acuáticos, y provienen de diversas fuentes; entre ellas, las de mayor impacto, las antropogénicas como las aguas residuales de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios agrícolas, pecuarios, domésticos (Romero, Colin, Sánchez, & Ortiz, 2009), descargadas puntualmente por tuberías o por escorrentía a través del suelo (Björklund *et al.*, 2009).

La eutrofización no es un problema ajeno al contexto colombiano. La presencia en diversos cuerpos de agua de fosfatos provenientes sobre todo del sector agrícola y detergentes de uso industrial y doméstico, además de las descargas de los diferentes sectores productivos, se han evidenciado en el río Bogotá, receptor de una de las zonas con mayor densidad poblacional en el país; por otro lado, según estudios del IDEAM, los ríos Cauca y Magdalena presentan indicios de eutrofización en algunos sectores, además de embalses como el de Tomine y Muña, y lagunas entre las que se encuentran las de Suesca, Fúquene y Tota (Moreno, 2013; Abella, 2012).

Teniendo en cuenta los efectos adversos que conlleva la eutrofización de un cuerpo de agua, y el papel del fósforo como factor limitante, en la búsqueda de alternativas tecnológicas eficientes y sostenibles para la remoción de fosfatos en aguas residuales, ¿el uso de un recurso natural de origen biológico basado en cultivo de *Chlorella sp.*, sería una alternativa tecnológica innovadora que contribuya a la remoción de fosfato en sistemas convencionales para el

tratamiento de aguas residuales domésticas implementados en las Empresas Prestadoras de los Servicios Públicos?

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad de remoción de fosfato en aguas residuales domésticas utilizando un cultivo de *Chlorella sp.*, en condiciones semicontroladas de laboratorio.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Determinar los parámetros de crecimiento de *Chlorella sp.*, en relación al medio de cultivo utilizado.

2.2.2. Determinar la concentración de fosfato removido del agua residual doméstica en función del uso de un cultivo de *Chlorella sp.*

2.2.3. Comparar la concentración de fosfato removida en el agua residual doméstica en función de los parámetros de crecimiento de *Chlorella sp.*

3. Justificación

Una de las alteraciones de mayor relevancia que afectan la calidad de los ecosistemas acuáticos continentales y que es producto de actividades antropogénicas, es el fenómeno de la eutrofización. Por ende, la remoción de los nutrientes que la provocan, particularmente el fósforo (Camargo & Alonso, 2007), es una de las principales preocupaciones ambientales que ha cobrado importancia desde hace ya algunas décadas, y que continúa generando la necesidad de la búsqueda de alternativas que permitan ofrecer soluciones sostenibles para la perdurabilidad de los cuerpos de agua y los servicios ambientales que provienen de ellos. Sin embargo, para que estas alternativas se consideren realmente efectivas, es importante que adicional a los buenos resultados se tengan en cuenta factores económicos y ambientales, y es en este punto donde los métodos biológicos representan una ventaja frente a los métodos químicos tradicionales (Wang, Poon & Cai, 2013).

Respecto a la remoción de fósforo de aguas residuales se han propuesto diversas alternativas tecnológicas e implementación de procesos naturales (Durán de Bazúa, 1994). Sin embargo, los diferentes métodos para el tratamiento de aguas residuales por lo general no están exentos de producir efluentes secundarios como lodos, que aun contienen significativas cargas de nutrientes (Abdel-Raouf *et al.*, 2012). Una alternativa para dar solución a este problema consiste en el empleo de microalgas debido a la capacidad de utilizar el nitrógeno y fósforo para su crecimiento. Los beneficios del tratamiento con microalgas se extienden a la reducción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), además de la remoción de nutrientes, a la inhibición de coliformes y otros patógenos (Sharifah & Eguchi, 2012), y la remoción de metales pesados (Abdel-Raouf *et al.*, 2012). Siendo así, se constituyen en un atractivo para complementar la

depuración por los sistemas de tratamiento convencionales de aguas residuales domésticas implementados por las Empresas Prestadoras de los Servicios Públicos (EPSP).

En Colombia, el Plan Nacional de Bioprospección Continental y Marina (Melgarejo, Sánchez, Reyes, Newmark & Santos-Acevedo, 2002), señala el importante papel que tiene la utilización del potencial biodiverso autóctono para el diseño e implementación de procesos tecnológicos que conduzcan a soluciones a problemas de los sectores industriales, farmacéutico, cosmético, alimentario y otros, dentro de un marco de la sostenibilidad. Basado en el factor de competitividad, las microalgas han sido utilizadas como un recurso biótico que mediante procesos de cultivos viables, sea para su explotación científica, tecnológica o biotecnológica, pueden derivar en productos y servicios con gran agregado. En este aspecto, *Chlorella sp.*, ha demostrado su eficiencia en el tratamiento de aguas residuales, logrando tasas de remoción por encima del 80% (Wang *et al.*, 2010) y más del 99% bajo condiciones controladas (Ahmad *et al.*, 2013), con la oportunidad de obtener biomasa con gran potencial de aprovechamiento, entre otros usos, para la producción de metano, biocombustibles, suplementos alimentarios para animales y acuicultura, y en la producción de químicos (Abdel-Raouf *et al.*, 2012).

En relación a lo anterior, se considera pertinente el desarrollo de proyectos pilotos de investigación orientados al uso de la biodiversidad, sus bienes y servicios, para la solución de problemas puntuales, como en este caso el uso sostenible de un recurso natural de origen biológico con el potencial de desarrollo de una alternativa tecnológica para la remoción de fosfatos en aguas residuales. En conformidad, el proyecto a desarrollar representa un aporte al conocimiento, haciendo parte de los cimientos para las primeras etapas de la investigación, logrando así los fundamentos básicos para conocer las condiciones óptimas y favorables de una biotecnología que tiene potencial para constituirse en la solución para uno de los problemas

ambientales de relevancia, como lo es la eutrofización, y a futuro, que pueda ser utilizado por otros sectores adquiriendo un valor comercial.

4. Marco Teórico y Estado del Arte

4.1. Antecedentes

La preocupación por los efectos que causa la eutrofización como resultado de los efluentes municipales inició en los años 40, ganando mayor visibilidad en los años 60. A causa de los impactos negativos de sus efectos y el rápido aumento de las condiciones tróficas de muchas de las aguas continentales que ha sido evidente en las últimas décadas, la eutrofización se ha convertido en una de las perturbaciones antropogénicas más extendidas y serias en los ecosistemas acuáticos (Peña, Palacios & Ospina, 2005; Camargo & Alonso, 2007). En los cuerpos de agua salada, el nutriente que más influye en la eutrofización es el nitrógeno, pero en los cuerpos de agua dulce el de mayor incidencia es el fósforo (Parry, 1998).

El fósforo es importante en el crecimiento reproductivo de organismos fotosintéticos como las plantas y el fitoplancton, y en la formación de ATP; generalmente, se encuentra en su estado oxidado como iones de ortofosfato inorgánico, o en compuestos orgánicos, y en cuanto a ecosistemas acuáticos se halla en mayores concentraciones en el sedimento que en la columna de agua. Como los organismos fotosintéticos remueven fósforo soluble de la columna de agua, este es liberado desde el sedimento al estar en contacto permanente con ella, si bien, el equilibrio de las concentraciones de fósforo entre el sedimento y el agua está controlado por muchos otros factores, tales como el pH y el oxígeno disuelto (Aertebjerg *et al.*, 2001).

Se han implementado numerosas alternativas tecnológicas para el tratamiento de aguas residuales provenientes tanto del sector doméstico, industrial y agropecuario, que implican métodos artificiales basados en sistemas ingenieriles para la remoción de nutrientes. Destacan la

implementación de reactores de lecho fluidizado con circulación interna (RALFCI), basados en el uso de biomasa activa con gran capacidad de remover excesos de materia orgánica y nitrógeno en agua residual (Teixeira *et al.*, 2013). De igual modo, como alternativas de eliminación del fósforo junto con el nitrógeno en el agua residual, se encuentran las lagunas de estabilización, los sistemas de disposición controlada en el suelo, los lodos activados y reactores aerobios con biopelícula y la remoción por procesos fisicoquímicos, o la combinación de algunos de los anteriores (Sperling, 2012).

Muchos métodos biológicos han sido desarrollados y usados para reducir la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), y remover nitrógeno y fosfatos del agua residual, dado que son considerados ambiental y económicamente favorables en comparación con los métodos tradicionales, tales como oxidación química, fotooxidación y absorción de carbono (Wang, Poon & Cai, 2013). Sin embargo, estos nutrientes son difíciles de remover.

Entendiendo que las soluciones sostenibles deben contemplar la integración de aspectos tecnológicos, sociales y ambientales propios de cada población, y comprender en la medida de lo posible la capacidad de remoción del medio natural y del potencial de reúso del agua residual y teniendo en cuenta, además, la interacción de los componentes naturales como el agua, suelo, plantas, microorganismos y atmósfera (Bernal *et al.*, 2008), una tecnología alternativa para la eliminación de fósforo del agua residual de forma natural ha sido la implementación de microalgas, aprovechando su habilidad de consumir nitrógeno, fosfato y carbón orgánico (Chisti, 2007). Su uso como tratamiento de aguas residuales fue propuesto por primera vez por Oswald & Gotaas en 1957, y ha recibido gran atención hacia las últimas décadas (Ruíz *et al.*, 2012).

Las microalgas han sido ampliamente utilizadas para tratamientos de aguas residuales tanto domésticas como industriales, constituyéndose en una tecnología de bajo costo pues

consisten en un sistema que recicla nutrientes como fósforo y nitrógeno (He *et al.*, 2013). Según Abdel-Raouf *et al.* (2012) estos microorganismos pueden reducir DBO, nutrientes como fósforo y nitrógeno, coliformes y metales pesados de las aguas residuales (Komolafe *et al.*, 2014). Además, no se producen lodos cuando las aguas residuales son tratadas con microalgas (Hsin-Hui *et al.*, 2015).

Dentro de las especies más estudiadas en remoción de contaminantes, se encuentra la *Chlorella sp.* (Hernández, de-Bashan & Bashan, 2006). Esta es una especie de rápido crecimiento y corto tiempo de generación, con la capacidad de tolerar condiciones ambientales rigurosas como las encontradas en las aguas residuales, asimilando eficientemente el nitrógeno y el fósforo del agua residual; esta especie tiene una alta capacidad de remoción de nutrientes (aproximadamente 80%) en tratamientos primarios y secundarios, y en ciertas condiciones puede remover completamente nitrógeno amoniacal, nitrato, nitrógeno y fósforo total (He *et al.*, 2013).

Otros estudios han apuntado a utilizar *Chlorella sp.*, para la remoción de nitrógeno, fósforo, demanda química de oxígeno (DQO) e iones metálicos presentes en las aguas residuales municipales. Wang *et al.*, (2009), de acuerdo a investigaciones realizadas, afirma que las microalgas se adaptan bien a las aguas residuales municipales, sin fases de retraso observado, demostrando ser viable para la remoción de los nutrientes, sin embargo, no como tratamiento terciario, y aclara que la propuesta de aplicar como un proceso de tratamiento secundario de aguas residuales tampoco está lista para implementación a gran escala.

Así mismo, al interior del país, se han realizado investigaciones utilizando *Chlorella vulgaris*, para la remoción de amonio y fósforo, durante el biotratamiento del efluente secundario de aguas residuales agroindustriales, provenientes de la industria láctea y la cría de cerdos; cuyos resultados demuestran que esta microalga tiene gran potencial en la reducción de la

contaminación ambiental, ocasionada por el agua residual agroindustrial que es vertida sin ningún tratamiento en cursos de agua y arroyos del país (González, Cañizares & Baena, 1997).

4.2. Marco conceptual

4.2.1. Generalidades de la especie *Chlorella sp.* *Chlorella sp.*, es un alga verde de forma elipsoidal, que crece en forma de células simples; posee un diámetro de 5 μ . Pertenece a la división *Chlorophyta* y a la clase de las *Chlorophyceae* (Infante *et al.*, 2012). Para esta especie, la temperatura óptima de crecimiento es 25°C y pH de 8.20.

Entre las ventajas del uso de esta especie como biosorbente, resultan su abundancia, facilidad de cultivo y su notable habilidad de crecer tanto autotrófica como mixotróficamente (Oh-Hama & Miyachi, 1998; Fu-Ying, Wen, Gui-Zhen, Yi-Nong & Ting-Yun, 2005), así como la obtención de diversos productos que le confieren gran interés biotecnológico y terapéutico. Entre dichos productos se destacan Factor de Crecimiento de *Chlorella* (*Chlorella Grow Factor*, CGF), que mejora el crecimiento de las bacterias lácticas. Así mismo, se ha propuesto como productora de almidón a nivel comercial (Pirt & Pirt, 1977); y algunas cepas termofílicas obtenidas por procesos mutagénicos presentan una elevada producción de luteína, pigmento utilizado en la industria alimenticia (Cohen, 1986). En términos de comidas naturales o dietéticas a base de microalgas, esta especie se consume en tabletas como preparado multivitamínico; también se consume como hierba medicinal, compuesta de *Chlorella* liofilizada en un 55%, que se utiliza como remedio contra numerosas enfermedades (Abalde *et al.*, 1995).

Adicionalmente, este género ha sido aplicado al tratamiento biológico de aguas residuales, probando su efectividad en la remoción de nitrógeno, fósforo, demanda química de oxígeno y

metales; su uso en aplicaciones de biorremediación ha sido bastante amplio, en forma suspendida o inmovilizada, como cepa pura o en asociación con otros microorganismos no fotosintéticos (Infante *et al.*, 2012; Garza, Almaguer, Rivera & Loredó, 2010).

4.2.2. Medios de cultivo. Los medios de cultivo utilizados para algas se pueden agrupar en tres categorías:

- Medios completamente sintéticos, con una composición química definida cualitativa y cuantitativamente.
- Medios basados en aguas naturales enriquecidas con suplemento mineral y utilización de residuos o aguas residuales.

4.2.3. Parámetros de cultivo. El crecimiento microalgal se rige por la ley del mínimo, es decir, el factor limitante del crecimiento es aquel que está presente en cantidades más próximas al mínimo crítico necesario para la microalga. El concepto se ha ido ampliando para incluir, no sólo deficiencias en los nutrientes químicos, sino también parámetros físicos como la luz, temperatura, etc., y parámetros ambientales que podrían limitar el crecimiento por exceso. Los niveles máximos y mínimos de tolerancia definen, por lo tanto, los límites de tolerancia de un organismo a cualquier factor ambiental. Es por ello, que es importante conocer las condiciones óptimas y los límites de tolerancia de una microalga para todos o el mayor número de parámetros; y para conseguir un cultivo de microalgas en crecimiento activo es necesario: un inóculo viable de tamaño mínimo, suministro de nutrientes y microelementos, en adecuadas condiciones físico químicas (temperatura, pH, etc.) y energía (Abalde *et al.*, 1995).

Los recipientes de cultivo comúnmente usados son de materiales no tóxicos como las cajas de Petri, matraces Erlenmeyer, matraces Ferenback, carboys o garrafas, entre otros, adecuados para cultivos de laboratorio.

4.2.4. Crecimiento Microbiano. Existen cuatro fases que se pueden diferenciar en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano en un cultivo discontinuo de microorganismos en medio líquido. Estas son:

- 4.2.4.1. Fase logarítmica o de adaptación. En este periodo, los microorganismos se adaptan al medio de cultivo, tomando los nutrientes necesarios para iniciar el crecimiento.
- 4.2.4.2. Fase exponencial. En esta etapa, los microorganismos se multiplican regularmente a ritmo constante con un alto grado de desarrollo; aquí se consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima, por lo cual, la velocidad de crecimiento depende de factores como temperatura, intensidad luminosa y composición del medio.
- 4.2.4.3. Fase estacionaria. Esta fase se presenta cuando los nutrientes se agotan; o, bien, los productos de desecho liberados durante la fase anterior se han acumulado, haciendo el medio inhóspito; lo cual conlleva a que se produzca un equilibrio entre el índice de supervivencia y mortalidad.
- 4.2.4.4. Fase de muerte. Finalmente, los microorganismos mueren más rápidamente, y el número de células desciende de forma exponencial (Figura 1).

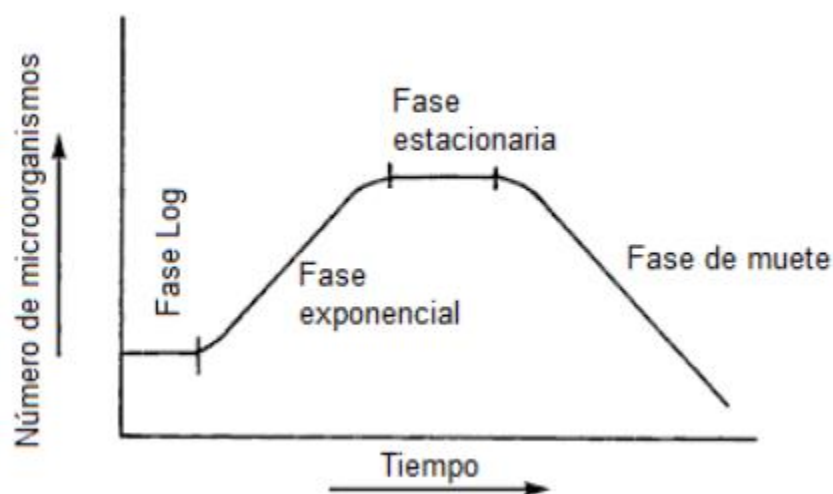


Figura 1. Esquema que representa la curva típica de crecimiento durante el desarrollo normal de un cultivo.

Fuente: Cristancho & Lagos, 2011.

4.2.5. Clorofila. Es el pigmento natural más abundante, encargado de proveer a las plantas su color verde característico; además de ser considerada una de las sustancias más importantes para la vida. Su principal función consiste en capturar la luz solar y redirigirla al centro de reacción donde se utiliza posteriormente para la conversión del Carbono y el agua en hidratos de carbono con liberación de oxígeno (Cristancho & Lagos, 2011). Hay dos tipos principales de clorofila, que difieren entre sí en su estructura molecular y en sus propiedades de absorción específica; éstas son: clorofila a y clorofila b (Figura 2).

4.2.5.1. Clorofila a. Se encuentra en todas las algas fotosintéticas y es el único pigmento que está directamente implicado en las reacciones luminosas; éste absorbe primordialmente luz de los campos azul-violeta y rojo del espectro. Es de color verde oscuro, debido a que refleja principalmente la luz verde.

4.2.5.2. **Clorofila b.** Es conocida como pigmento accesorio, puesto que no participa directamente en las reacciones luminosas, sino que transmite la energía absorbida a aquellas moléculas de clorofila a que están directamente implicadas. Sin embargo, es de gran importancia, debido a que amplía la gama de luz que se puede usar en la fotosíntesis (Cristancho & Lagos, 2011).

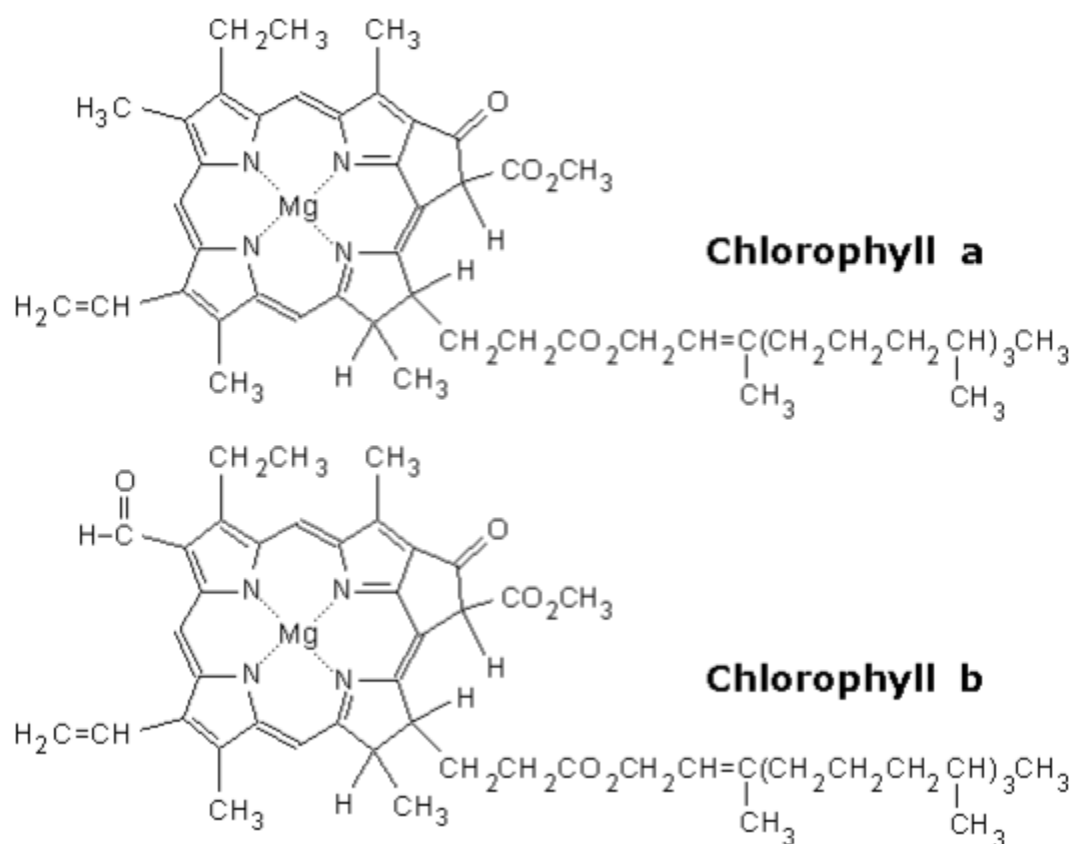


Figura 2. Estructura de las moléculas de clorofila a y clorofila b.

Fuente: Cristancho & Lagos, 2011.

4.2.6. Técnica de aislamiento. Existen varios métodos de aislamiento, que dependen de las dimensiones de las microalgas, de su movilidad y de su morfología.

4.2.6.1. **Rayado de placas de agar.** Se transfieren pequeñas gotas del cultivo de microalgas con un asa de siembra, extendiendo por estrías (rompiendo un poco el agar). Este agar se prepara con una solución nutritiva para microalgas y con una relación de 1–1.5% w/v de agar disuelto en el medio nutritivo, se incuba la placa bajo iluminación a 18–20°. De este primer crecimiento se transfiere a tubos con agar inclinado sembrando por estrías o bien, se transfiere a medios líquidos en subcultivos sucesivos para su purificación, de tal manera que en cada dilución se reduzca el número de organismos en una gota; es recomendable combinar la técnica de diluciones con la de transferencia en placa de agar o tubo inclinado para obtener cultivos clonales (de una sola colonia o célula) y poder establecer el cultivo monoespecífico. Después de 10 días, pequeñas colonias aparecen sobre la superficie del agar, que se pueden transferir mediante el Método de Hocking o de la micropipeta a medios líquidos (Torretera & Tacón, 1989).

4.2.6.2. **Pipeteo capilar:** Mediante una pipeta construida con un tubo capilar, a través del microscopio óptico se “pesca” las células y se separan en pequeñas gotas de nutrientes colocados alrededor de una Caja de Petri o en portaobjetos escabados. Esta técnica es utilizada para separar microalgas mayores de 10 μ (Torretera & Tacón, 1989).

4.2.6.3. **Diluciones seriadas o sucesivas.** Antes de iniciar las tareas de aislamiento, es necesario calcular la concentración celular de la microalga de interés, con el objeto de calcular el número de diluciones necesario para disminuir la concentración a unas cuantas células/ml. Generalmente se toma 1 ml de la muestra original y se agrega a un tubo de ensayo que contiene 9 ml de medio de cultivo estéril, se homogeniza y luego se agrega 1 ml a un segundo tubo con 9ml de medio, se homogeniza y así sucesivamente. El número de diluciones depende de la concentración de la microalga que se pretende aislar (Tecnoplades, 2013).

4.2.7. Fosfatos en el agua residual. El fósforo puede estar presente formando estructuras orgánicas como fosfolípidos y fragmentos de cadenas peptídicas, pero esto en menor proporción. Por otro lado, los fosfatos son la principal presentación del fósforo en aguas naturales y residuales.

Entre las diferentes formas, se encuentran polifosfatos tales como metafosfato, tripolifosfato y pirofosfosfato. Los polifosfatos son considerados polímeros de ácido fosfórico deshidratados. Eventualmente los polifosfatos terminan convirtiéndose en ortofosfatos (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , H_3PO_4) a través de hidrólisis. Los ortofosfatos por su parte, son la forma más relevante de fósforo en el agua pues constituyen la mayor contribución al fósforo disuelto total. Sumado a lo anterior, las demás formas de fósforo se transforman en ortofosfatos por acción del calentamiento. La distribución de diferentes presentaciones del ortofosfato, a su vez, depende de factores como el pH (Moreno, 2013).

4.3. Marco legal

La presencia de fosfatos en el agua se incluye dentro de la categoría de características químicas que tienen consecuencias económicas e indirectas sobre la salud humana, como lo menciona la Resolución 2115 de 2007 en su artículo 7º, para lo cual se ha fijado un valor máximo permisible de 0,5 mg/L en agua para consumo.

Pero en cuanto a lo concerniente al presente proyecto, que son las descargas de aguas residuales, la regulación se remonta a una norma que estuvo vigente por más de treinta años, el Decreto 1594 de 1984. Sin embargo, para enfrentar la nueva realidad urbana, industrial y ambiental del país, el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible creó la Norma de Vertimientos Puntuales a Cuerpos de Aguas Superficiales y a los Sistemas de Alcantarillado Público, Decreto 631 de 2015, que intenta abarcar las especificaciones para cada actividad en diferentes sectores económicos. Por supuesto, las Empresas Prestadoras de los Servicios Públicos (EPSP) de Alcantarillado no están exentas de su influencia. Con respecto a los ortofosfatos y fósforo total, aunque no se define un límite máximo permisible, se exige el análisis y reporte de dichos parámetros.

5. Metodología

5.1. Tipo de investigación

Este estudio corresponde a una investigación de tipo experimental en condiciones semicontroladas de laboratorio.

5.2. Lugar de estudio

El montaje y desarrollo se realizó en el laboratorio del Centro de Investigaciones Tecnológicas Ambientales (CITA) de la Corporación Universidad de la Costa, en Barranquilla, Atlántico.

5.3. Población y muestra

La población del material biológico experimental estuvo representada por células de *Chlorella sp.* (Figura 3), cultivadas monoespecíficamente mediante técnicas de cultivos discontinuos, las cuales se depositaron en frascos de vidrio bajo condiciones de laboratorio.

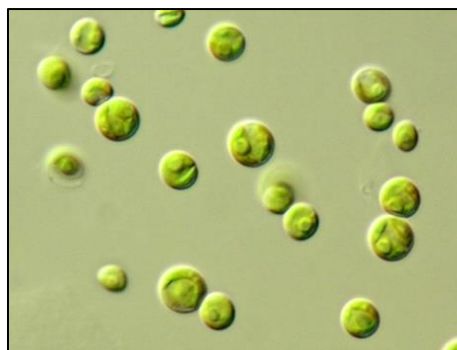


Figura 3. Fotografía de células de *Chlorella sp.*

Fuente: Center for freshwater biology

5.4. Diseño de investigación

5.4.1. Preparación del medio de cultivo «stock». La preparación de los medios y obtención de los cultivos «stock» de la cepa de *Chlorella sp.*, se realizó en el laboratorio del Centro de Investigaciones Tecnológicas Ambientales CITA de la Universidad de la Costa. A cada cultivo se le realizaron observaciones microscópicas (40X) con el propósito de detectar presencia de cepas monoalgales, luego almacenadas en viales de aislamiento.

5.4.1.1. **Método de rayado en placas de agar.** Este método permite el aislamiento efectivo de células y obtener cultivos monoclonales. Se preparó medio Agar-Agar (Figura 4), vertido en placa de Petri (100 x 15 mm). Una vez enfriado las placas, se adicionaron 1 a 2 gotas del cultivo de los viales de aislamiento, esparciéndose sucesivamente las células algales en la superficie del medio, utilizando un asa de siembra. Este procedimiento se realizó con mechero Bunsen encendido para evitar contaminación. Cada placa sembrada fue cubierta con plásticos de polietileno (cinta de enmascarar), colocadas en forma invertida a una fuente de luz (lámparas

Daylight de $120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), e incubadas a 21-23 °C. En el momento de aparición de colonias algales en la superficie del agar, se removió con asa de siembra una pequeña porción y adicionó en una gota esterilizada de Bold's Basal Medium (BBM); luego se verificó la presencia de cepas puras de *Chlorella sp.* mediante observación en el microscopio óptico marca Nikon Labophot CF. Por último, las cepas aisladas fueron inoculadas en frascos Erlenmeyer de 50 ml con 30 mL de medio BBM, solución que contiene macro y micronutrientes minerales en agua destilada estéril, ampliamente utilizado para el cultivo de microalgas de agua dulce (Connon, 2007) (Tabla 1).



Figura 4. Fotografía de procedimiento de preparación de medio Agar-Agar.

Fuente: Autores.

	Composición	Aforar a un litro de agua destilada
Reactivos	KH_2PO_4	175 mg
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25 mg
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	75 mg
	NaNO_3	250 mg
	K_2HPO_4	75 mg
	NaCl	25 mg
	H_3BO_3	11.42 mg
	Solución de Micronutrientes	1 mL
	Solución 1	1 mL
	Solución 2	1 mL
Solución de Micronutrientes	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.82 g
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.44 g
	MoO_3	0.71 g
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.57 g
	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.49 g
Solución 1	Na_2EDTA	50 g
	KOH	3.1 g
Solución 2	FeSO_4	4.98 g
	H_2SO_4	1 mL
pH = 6.8		

Tabla 1. *Composición química del medio BBM.*

Fuente: Autores, basada en Bioencyclopedia.com.

Al cabo de 12 días de aislar la cepa mediante el método de rayados en agar (Figura 5 a 7), previamente descritos, se inocularon en frascos Erlenmeyer de 50 ml con medio BBM estéril, durante 15 días.



Figura 5. *Fotografía de procedimiento de rayado en agar Chlorella sp.*

Fuente: Autores.

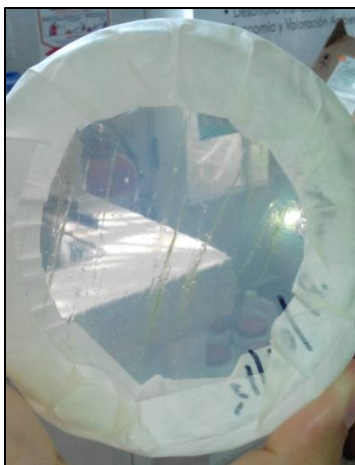


Figura 6. *Fotografía de procedimiento de rayado en agar Chlorella sp.*

Fuente: Autores.



Figura 7. Fotografía de caja de Petri a los 7 días de haber realizado el método de rayado en agar *Chlorella sp.*

Fuente: Autores.

5.4.2. Obtención de agua residual. El agua residual utilizada para esta investigación, se obtuvo de la primera etapa del pretratamiento de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) domésticas del Sur Occidente de Barranquilla “EDAR EL PUEBLO”; cuyas aguas residuales domésticas son las originadas en el suroccidente de Barranquilla y son conducidas por gravedad, mediante una serie de colectores, hasta la EDAR, la cual está conformada por dos estaciones de bombeo y un sistema de lagunas de estabilización. Una vez el agua llega a la estación, pasa inicialmente por una estructura de llegada o control, en la cual se encuentra ubicada la canaleta Parshall, para medición de caudales. Posteriormente, el agua residual pasa al canal de rejillas, en donde se efectúa el desbaste de sólidos, siendo ésta la primera etapa del pretratamiento; después del desbaste, el agua residual pasa a un canal de distribución, y de ahí a los desarenadores, luego

circula hacia los pozos de succión en donde es bombeada hasta las cajas de distribución ubicadas frente a los módulos o sistemas de lagunas, en donde se lleva a cabo la eliminación de los contaminantes por acción biológica de los microorganismos (algas y bacterias) (Triple A, sf.).

5.4.3. Preparación del agua residual para los bioensayos. Antes de realizar el montaje de los bioensayos, el agua proveniente de la EDAR, se filtró dos veces en el laboratorio, con papel Whatman N°42 (Figura 8).



Figura 8. *Fotografía de proceso de filtración de Agua Residual.*

Fuente: Autores.

5.4.4. Diseño experimental. Inicialmente, se realizó un ensayo preliminar, en el que la cepa se inoculó en diferentes medios: agua residual filtrada, agua residual filtrada-estéril y BBM como

control; para lo cual, se realizó el monitoreo, día por medio, del crecimiento del cultivo en cada medio, hasta la fase estacionaria de la cepa. Con lo anterior, se estableció el tratamiento de agua residual a utilizar en función del crecimiento óptimo de la microalga en cada bioensayo.

Para el proyecto, se hicieron dos experimentos de prueba simultáneos en condiciones de laboratorio: i) Agua residual filtrada y microalga; comparados con ii) un tratamiento control con únicamente agua residual filtrada, cada uno con su respectiva réplica (Figura 9 y 10).

Se aplicó la técnica de cultivo discontinuo al bioensayo que contenía el agua residual filtrada y microalga, y a su réplica respectiva, en recipientes de vidrio de 1000 mL, a los cuales se le adicionó 20 mL de cultivo de *Chlorella sp.*, con un inóculo inicial de 43.1×10^6 cel/mL. Cada cultivo se agitó manualmente tres veces al día –horas de la mañana, mediodía y en la tarde– durante toda la fase experimental. El factor luz fue controlado; se mantuvo a una radiación de $137 \mu\text{mol} \cdot \text{q} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, bajo ciclos de luz:oscuridad de 12:12 horas, a una temperatura promedio de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ con aireación discontinua por un período de 15 días.



Figura 9. Fotografía de Tratamiento de ARF + MA Réplica 2.

Fuente: Autores.



Figura 10. *Fotografía de Tratamiento de ARF Réplica 2.*

Fuente: Autores.

5.5. Determinaciones Analíticas de los Bioensayos

5.5.1. Monitoreo del crecimiento de cultivo. Se emplearon como variables de respuesta la concentración celular, pigmentos cloroplásticos, pH y concentraciones de PO_4^{3-} .

5.5.1.1. Concentración celular. Para determinar la concentración celular se realizaron conteos algales cada 2 días, usando un hematocitómetro Neubauer de 0.1 mm de profundidad (cel.mL^{-1}) en microscopio óptico binocular (Figura 11), desde el inicio hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo. La densidad celular (células/mL) se estimó según la ecuación 1.

Ecuación 1

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Células Contadas} \times 250000}{\text{Cuadros Contados}}$$

Donde Concentración es la densidad celular (células/mL),

Células Contadas, es la suma de todas las células contadas en todos los cuadros

Cuadros Contados, es la cantidad de cuadros contados del hematocitómetro Neubauer

5.5.1.1.1. Curva de crecimiento poblacional. La curva de crecimiento poblacional se calculó utilizando las concentraciones determinadas de cada unidad experimental versus el tiempo de duración del experimento. Se graficó en escala semilogarítmica con la ayuda del programa Microsoft Excel.

5.5.1.1.2. Tasa específica de crecimiento. En la fase de crecimiento exponencial se calculó la tasa específica de crecimiento o velocidad de crecimiento expresada en divisiones/día por medio de la ecuación 2 (Guillard, 1973).

Ecuación 2

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{t_1 - t_0}$$

Donde,

μ es la tasa específica de crecimiento,

$X_1 - X_0$, es la diferencia entre densidad celular final y densidad celular inicial

$t_1 - t_0$, es la diferencia entre tiempo final y tiempo inicial

5.5.1.1.3. *Tiempo de duplicación.* El tiempo de duplicación (T_d), representa el tiempo en que se divide una población, se calculó por medio de la ecuación 3 (Guillard, 1973) expresada en divisiones/día.

Ecuación 3

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde,

T_d es el tiempo de duplicación en días,

$\ln 2$, es el logaritmo natural de 2

μ es la tasa específica de crecimiento



Figura 11. *Fotografía de procedimiento de conteo celular.*

Fuente: Autores.

5.5.1.2. Determinación de la producción de pigmentos cloroplásticos.

5.5.1.2.1. Contenido total de clorofila α y β . Para la determinación del contenido total de la clorofila α y β se colectaron 3 ml de cultivo en cada una de las unidades experimentales en tubos de reacción de 15 ml de capacidad durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria, la muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos con el propósito de sedimentar la biomasa microalgal y descartar el sobrenadante. Para la extracción de los pigmentos del material sedimentado, se resuspendió en 10 ml de acetona al 90% marca Merck y agitó durante un minuto; luego se almacenaron los tubos sellados (todos forrados con papel craft para evitar la degradación de las muestras) en un refrigerador a una temperatura de 3° C durante 24 horas, lapso en el que se da el proceso de extracción (Wegmann & Metzner, 1971). Por último, al material sobrenadante – el solvente con los pigmentos extraídos– se le midió la absorbancia (A) a longitudes de onda de 570, 600 y 650 nm en un fotómetro visible contra un blanco de acetona al 90% marca Merck. (Ver Anexos).

La concentración de los pigmentos de clorofila α y β se calculó según la ecuación de Jeffrey & Humphrey (1975) (Ecuación 4).

Ecuación 4

$$\text{Clorofila } \alpha \text{ (}\mu\text{g/mL)} = (11.93 \times A_{664} - 1.93 \times A_{647}) / v \times V$$

$$\text{Clorofila } \beta \text{ (}\mu\text{g/mL)} = (20.36 \times A_{647} - 5.50 \times A_{664}) / v \times V$$

$$\text{Clorofila } \alpha + \beta \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{clorofila total}$$

Donde,

v es el volumen de acetona (mL), y

V es el volumen de la muestra tomada del cultivo (L)

5.5.1.3. Monitoreo de pH. Se monitoreó diariamente con *pHmetro WTW 315i* durante 15 días, tiempo de duración de la fase experimental.

5.5.2. Determinación de las concentraciones de fosfato (PO₄). La determinación de las concentraciones de fosfato se realizó de acuerdo al método Pallintest Phosphate HR, basado a su vez en el método del vanadomolibdato. Este método consiste en adicionar 5 mL de muestra y 5 mL de agua destilada en un tubo de fotómetro, y repetir el mismo procedimiento para otro tubo de prueba. Luego, a uno de los tubos se le adiciona una tableta triturada de HR del kit Pallintest Phosphate HR, se mezcla y esperan 10 minutos para que la coloración se desarrolle completamente, en el fotómetro se selecciona Phot 29 y se monta el blanco que contiene los 5 mL de cultivo y 5mL de agua destilada en el tubo de prueba; luego se monta el tubo al que se adicionó la tableta de HR triturada y se toma la lectura de la medición, cuyo valor se multiplica por el factor de conversión: 2. (ver Anexos).

5.6. Análisis Estadístico

Para evaluar el efecto del tratamiento y del tiempo sobre la remoción de fosfato se aplicó un modelo de regresión simple, para determinar el efecto de la concentración de fosfato sobre la población de *Chlorella sp.*, y su cinética de crecimiento, se realizó un ANOVA multifactorial, teniendo como factores los tiempos de exposición y las concentraciones. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado y sus datos se trataron estadísticamente empleando el software Statgraphics versión XVI.

6. Resultados y análisis

6.1. Determinación de los parámetros de crecimiento de *Chlorella sp.*, en relación al medio de cultivo utilizado

Teniendo en cuenta que en un cultivo discontinuo de microorganismos en medio líquido, como el utilizado en la presente investigación, se diferencian cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano: fase logarítmica o de adaptación, fase exponencial, fase estacionaria, y fase de muerte (Cristancho & Lagos, 2011); la descripción de los resultados se efectuó considerando el metabolismo de la cepa durante cada una de sus fases de crecimiento.

En la fase preliminar de la experimentación, se determinaron los parámetros de crecimiento de *Chlorella sp.*: conteo celular (Figura 12), se calculó la tasa específica de crecimiento y el tiempo de duplicación de la cepa en tres bioensayos: BBM (control), Agua Residual Filtrada y Agua Residual Estéril.

Con el medio de cultivo BBM, durante los primeros cuatro días, la cepa mostró un crecimiento acelerado en el Tiempo de Duplicación (T_d) calculado de $2,7 \pm 0,7$ días; posterior a este período de tiempo, fue notorio que la cepa continuó creciendo exponencialmente, hasta el día 13, en adelante, donde la curva evidencia el inicio de la fase estacionaria ($4,5 \pm 0,7$ días).

Para el caso del medio de cultivo agua residual filtrada, tal como se evidencia en la Tabla 2, el crecimiento de la cepa fue lento en los primeros días, con una MDC de $0,1 \pm 0,1 \times 10^6$ cel.mL⁻¹ al día 4; sin embargo, hubo un incremento en la curva de crecimiento, alcanzando una

MDC de $14 \pm 1,3 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ al día 14, siendo mayor al valor registrado por la cepa en el control $-12,9 \pm 3,7 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$.

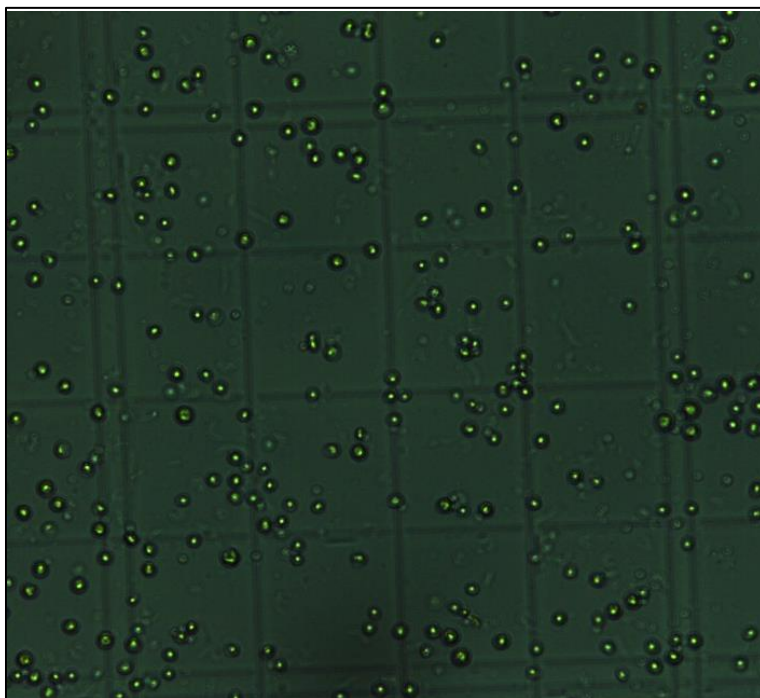


Figura 12. Fotografía de muestra del cultivo de *Chlorella sp.*, en cámara de Neubauer a través del microscopio.

Fuente: Autores.

A diferencia de los anteriores, en el medio de cultivo Agua Residual Estéril, el cultivo presentó un crecimiento exponencial; sin embargo, no alcanzó valores de MDC iguales o mayores a los registrados con el medio de cultivo ARF o el control; en cuanto al tiempo de duplicación, inicialmente –día 4–, era de $8,96 \pm 7,88$ días, en la fase exponencial disminuyó a $3,80 \pm 1,19$ días, aunque en la fase estacionaria aumentó nuevamente a $7,43 \pm 0,59$ días. (Figura 13).

A partir de lo anterior, es posible afirmar que las fases de crecimiento de *Chlorella sp.*, en cada uno de los medios de cultivo utilizados durante la experimentación preliminar del proyecto, presentaron comportamientos diferentes, en términos de los parámetros de crecimiento –*densidad celular, tasa y tiempo de duplicación*-. Aunque, esta microalga “presenta una alta eficiencia en productividad por su fácil adaptación en condiciones de laboratorio” (Mora *et al.*, 2005); según Cristancho & Lagos (2011), existen tres componentes que influyen en el crecimiento de *Chlorella sp.*: un recipiente o sistema de cultivo adecuado, el factor aireación y el medio de cultivo en el cual las microalgas puedan crecer. Además, como indican Mora *et al.* (2005), el crecimiento y producción de pigmentos de *Chlorella sp.*, en cultivos discontinuos, está influenciado por parámetros tales como: la intensidad luminosa, temperatura y pH.

Considerando que las tres unidades experimentales estaban en igualdad de condiciones en cuanto a los parámetros de cultivo: intensidad luminosa y temperatura, y los componentes: sistema de cultivo y factor aireación, -siendo éste último suministrado a través de agitación manual tres veces al día- se evidencia, que el componente que afectó el crecimiento de la cepa fue el medio de cultivo (AR). Vera, Martínez, Morillo & Montes (2004), afirman que “la cinética del crecimiento de *Chlorella sp.*, depende de la composición del sustrato empleado” Así mismo, Muñoz *et al.*, (2012), señalan que la tarea de seleccionar el medio de cultivo para que crezca la cepa, sustenta su importancia en el hecho de que el uso de un sustrato adecuado puede optimizar el valor nutricional de éstos y, por ende, la eficiencia en el crecimiento de la microalga.

El mayor crecimiento celular del cultivo con agua residual, indica que este medio contiene alta disponibilidad de nutrientes y, por lo tanto, contiene sustratos alternativos para el desarrollo de *Chlorella sp.* Algunos autores, como Chacón, Andrade, Cárdenas, Araujo & Morales (2004), afirman que “la presencia de bacterias y de otras especies de microalgas, asociadas al agua

residual y no descartadas en el proceso de filtración, podrían disminuir la disponibilidad de nutrientes por el efecto de competencia”, no obstante, de-Bashan & Bashan (2003), afirman que existen bacterias que promueven el crecimiento de las microalgas, como *Chlorella sp.*, con la capacidad de aumentar la eliminación de nutrientes de las aguas residuales.

En el caso de la presente investigación, en los primeros días del experimento de la fase preliminar, la cepa en el medio de cultivo de agua residual filtrada presentó una densidad poblacional menor a la del tratamiento con agua residual estéril y el control, lo que puede asociarse con la disponibilidad de nutrientes por el efecto de competencia que pudo significar la presencia de otras especies de microalgas o bacterias que no se eliminaron en el proceso de filtración; sin embargo, se evidencia que al pasar de los días, la cepa logró adaptarse al medio con agua residual filtrada, alcanzando incluso mayor densidad celular, que la observada en el control y el tratamiento con agua residual estéril (Figura 13). Lo cual se relaciona a la condición propia del medio, puesto que, en concordancia con Chacón, Andrade, Cárdenas, Araujo & Morales (2004), como resultado del proceso de esterilización, en el agua residual se presenta una disminución de nutrientes y de la carga bacteriana asociada, en relación al filtrado que sólo retiene sólidos totales de mayor tamaño en suspensión.

Medio de Cultivo	Tiempo (días)	MDC (10^6 cel.mL ⁻¹) \pm SD	μ (día ⁻¹)	T _d (días)
BBM	4	3,8 \pm 0,8	0,3 \pm 0,1	2,7 \pm 0,7
	8	6,0 \pm 1,6	0,2 \pm 0,0	4,0 \pm 0,9
	14	12,9 \pm 3,7	0,2 \pm 0,0	4,5 \pm 0,7
Agua Residual Estéril	4	1,0 \pm 0,3	0,1 \pm 0,1	9,0 \pm 7,9
	8	2,6 \pm 1,1	0,2 \pm 0,1	3,8 \pm 1,2
	14	2,2 \pm 0,2	0,1 \pm 0,0	7,4 \pm 0,6
Agua Residual Filtrada	4	0,1 \pm 0,0	-0,4 \pm 0,1	-1,7 \pm 0,4
	8	3,4 \pm 1,1	0,3 \pm 0,1	2,4 \pm 0,4
	14	14 \pm 1,3	0,3 \pm 0	2,6 \pm 0,1

Tabla 2. *Parámetros de crecimiento de Chlorella sp., en las fases de crecimiento, experimento preliminar.*

Fuente: Autores.

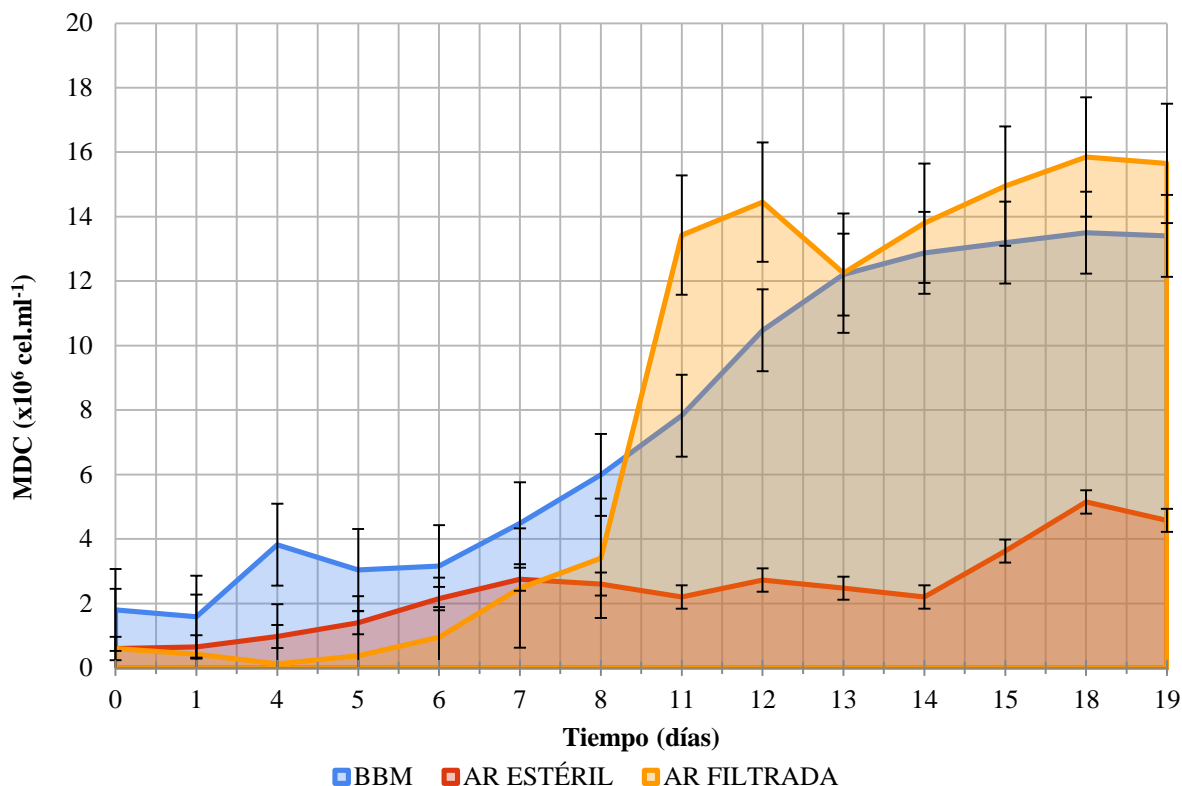


Figura 13. Crecimiento de *Chlorella* sp., en función del tiempo, experimento preliminar.

Fuente: Autores.

En la siguiente fase del proyecto, se realizó el experimento central de la investigación, según la metodología establecida.

El tratamiento de ARF+Microalga, presentó una MDC de $6,9 \pm 1,1 \times 10^6$ cel.mL⁻¹, en su fase exponencial, presentando un T_d de $2,8 \pm 0,2$ días (Tabla 3). Durante los primeros cuatro días, la cepa mostró un crecimiento lento, lo cual corresponde a la fase inicial en la que se presentó una densidad celular de $0,6 \pm 0,2 \times 10^6$ cel.mL⁻¹, posterior a este período de tiempo, se evidenció un crecimiento acelerado hasta el día 14. (Figura 14).

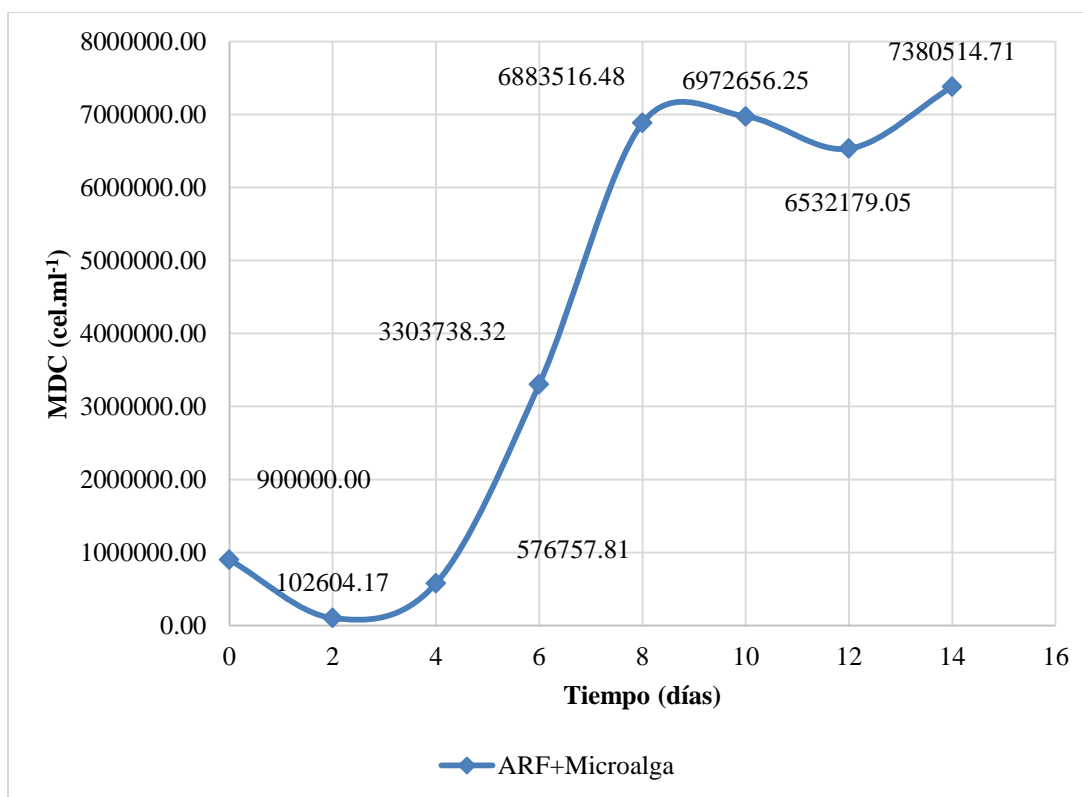


Figura 14. Crecimiento de *Chlorella sp.*, en función del tiempo.

Fuente: Autores.

Concentración de Clorofila Total

Las microalgas son un área innovadora y dinámica en biotecnología, debido a que son fuentes de productos biológicos con gran valor, tales como pigmentos, vitaminas, minerales y otros con gran potencial para muchas industrias (El-Bahbohy *et al.*, 2016); de ahí el amplio uso de *Chlorella sp.*, en la industria farmacéutica. Pues, de acuerdo con Cristancho & Lagos (2011), los pigmentos fotosintéticos como la clorofila son esenciales en muchos productos de uso diario, entre ellos los productos farmacéuticos y cosméticos, además de agentes colorantes naturales.

Para la experimentación, el contenido de Clorofila Total estuvo relacionada a las densidades celulares de *Chlorella sp.*, es por esto que, durante la fase de adaptación, la concentración de clorofila estuvo en 3137,9 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 3) y, posteriormente, en la fase exponencial, se observa la mayor concentración de clorofila con un valor de 6723,7 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 15).

Tratamientos	Tiempo (días)	MDC (10^6 cel.ml^{-1}) \pm SD	μ (div/día)	T_d (días)	PCCIT ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD
ARF+Microalga	4	0,6 \pm 0,2	-0,1 \pm 0,1	-2 \pm 11,7	3134,9 \pm 0
	8	6,9 \pm 1,1	0,3 \pm 0	2,8 \pm 0,2	6723,7 \pm 185,7
	14	7,4 \pm 0,7	0,2 \pm 0	4,6 \pm 0,2	3321,6 \pm 0

Tabla 3. *Parámetros de crecimiento de Chlorella sp., en las fases de crecimiento.*

Fuente: Autores.

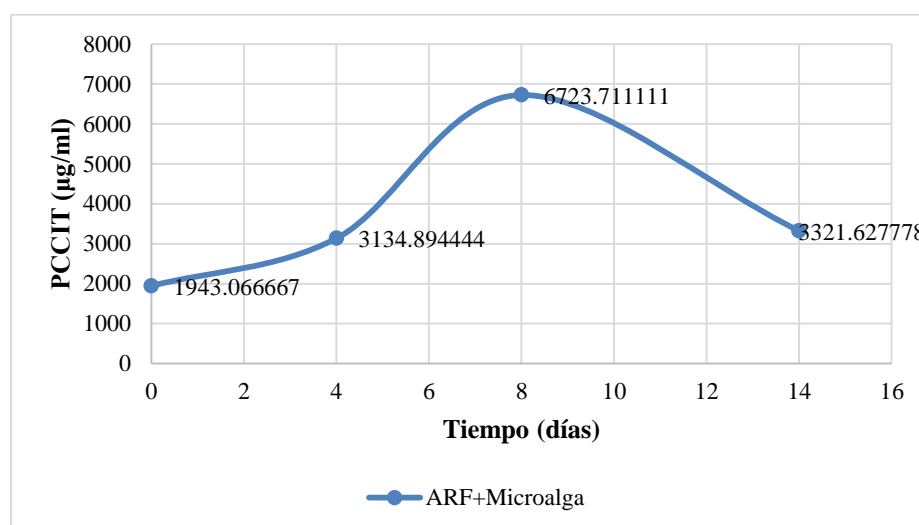


Figura 15. *Concentración de Clorofila Total, en función del tiempo.*

Fuente: Autores.

Medición de pH

En relación al pH, determinado en el bioensayo de ARF + MA, se observó una tendencia a su aumento a medida que transcurría el tiempo de duración de la experimentación y, que aumentaba la población celular de *Chlorella sp.*, de manera que, desde el día 4 al 10 el valor pasó de 7,5 a 11 unidades.

Este resultado se relaciona con los estudios realizados por Dorling *et al.* (1997), en el cual afirman que las microalgas, por lo general, presentan pH óptimos para su crecimiento y producción de pigmentos en rangos neutros a alcalinos, lo cual es congruente con los resultados obtenidos; puesto que la fase de crecimiento exponencial (Figura 14), coincide con el aumento del pH (Figura 16).

Así mismo, Gallego (2013), explica que la variación de pH puede afectar el metabolismo y el crecimiento de las microalgas, incluyendo alteraciones en el equilibrio de las especies de carbono inorgánico, alteraciones en la disponibilidad de nutrientes y, en ocasiones extremas, puede afectar directamente la fisiología de la célula microalgal.

Y a su vez, Moronta, Mora & Morales (2006), Mora *et al.* (2005) y Romero, Miyashita & Kurano (2000), aseguran que la densidad celular de *Chlorella* se optimiza en el rango de pH alcalino cuando el valor de pH registrado es de 9 unidades.

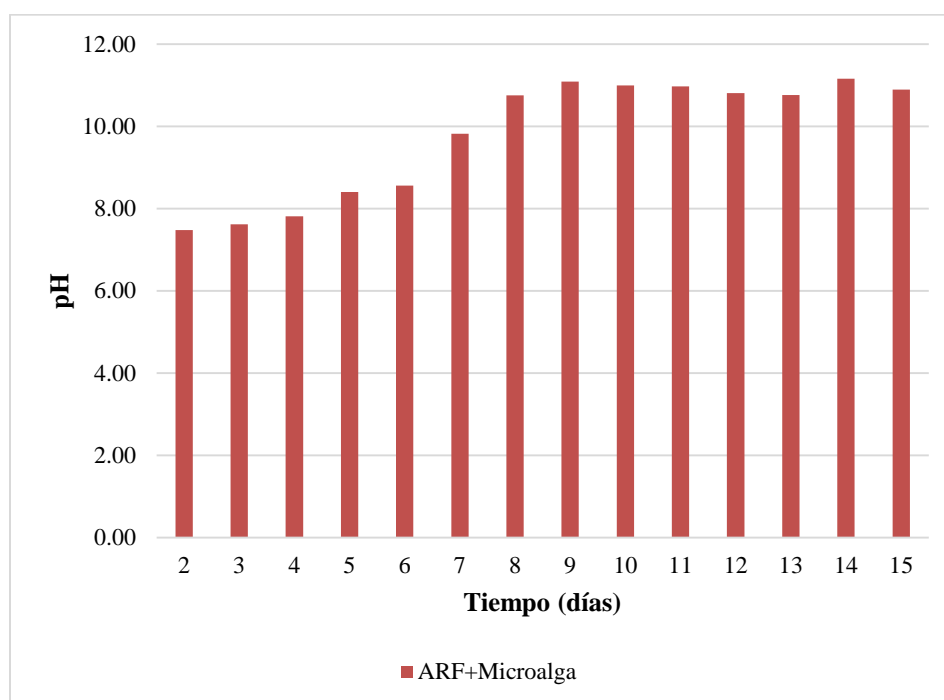


Figura 16. Valores de *pH*, en función del tiempo.

Fuente: Autores.

6.2. Determinación de la concentración de fosfato removido del agua residual doméstica en función del uso de un cultivo de *Chlorella sp.*

Los valores promedios de las concentraciones del ion PO_4^{3-} del Tratamiento ARF + Microalga y del control (ARF), están resumidos en la tabla 4, desde el día 0 del experimento y durante las fases de crecimiento de *Chlorella sp.* Se observó que las concentraciones del ion PO_4^{3-} descendieron en el Tratamiento ARF + Microalga desde la fase inicial hasta la fase exponencial.

En el Control, igualmente se evidencia una disminución en la concentración del ion PO_4^{3-} ; sin embargo, como se observa, la concentración inicial del control, 47,9 mg/L, dista de la

obtenida en el Tratamiento de ARF + Microalga, 57,6 mg/L, además de que los valores de concentración de fosfato en el Tratamiento de ARF + Microalga siempre se encuentran por debajo de los obtenidos en el control durante cada una de las fases.

Mediante un modelo de regresión simple, se encontró que existe una influencia estadísticamente significativa entre los niveles de PO_4^{3-} y Clorofila Total (CIT), con $p\text{-valor}=0,0055$ y $R^2=43.4564\%$, el cual no significa que no exista una relación entre las variables independientes y la concentración de fosfato, sino que señala que el modelo explica el 43% de la variabilidad inherente en la remoción de fosfato; además, se encontró que a medida que hay una disminución en los niveles de CIT, aumenta la concentración de PO_4^{3-} (Figura 17). Tales niveles de CIT están relacionados a la presencia y crecimiento de la microalga y ésta, a su vez, consume fosfato, lo que explica la relación existente entre los niveles de CIT y la concentración de PO_4^{3-} . Es decir, cuando hay una disminución de la población, por causas de competencia en el medio, los niveles de CIT disminuyen y, de manera inversamente proporcional, las concentraciones de fosfato aumentan.

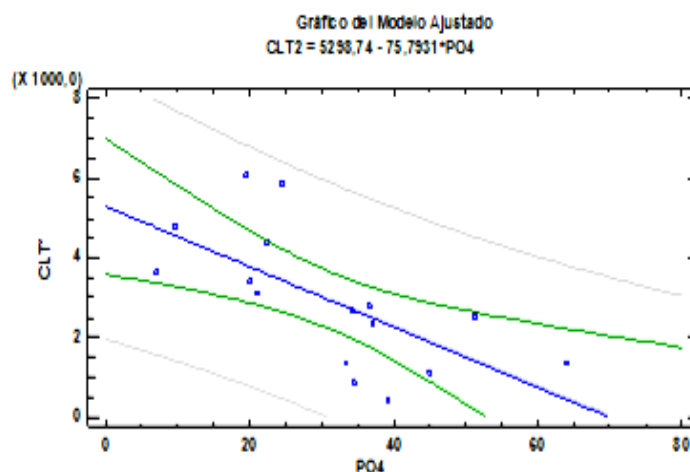


Figura 17. Gráfico del modelo ajustado CLT vs PO_4^{3-} .

Fuente: Autores.

Las microalgas han sido ampliamente estudiadas en el marco de la producción de biocombustible, por su alto rendimiento, a comparación de los cultivos de semillas oleaginosas terrestres y de su capacidad de asimilar el dióxido de carbono, pues se constituyen en candidatas perfectas para la reducción de gases de efecto invernadero y el reemplazo de los combustibles fósiles (Wang *et al.*, 2009). Además, como se ha anotado anteriormente, tienen la capacidad de generar biomasa que puede ser usada en la producción de alimentos, concentrados, compuestos bioactivos y la producción de biofertilizantes (Chisti, 2007).

Sin embargo, una de las limitantes principales del cultivo a escala industrial de las microalgas son los costos de los componentes del medio de cultivo, que generalmente contiene fertilizantes inorgánicos derivados del petróleo (Chisti, 2007). Razón por la cual, se han realizado estudios que permitan explorar el potencial de estas microalgas, utilizando otros medios de cultivo menos costosos, pero que contengan los nutrientes necesarios para que éstas puedan

crecer adecuadamente, pues a mayor disponibilidad de nutrientes, mayor será el crecimiento de la microalga.

Cabe señalar que entre los nutrientes necesarios para la obtención de rendimientos significativos y eficientes con fines biotecnológicos se encuentran: carbono, nitrógeno y fósforo (Kim, Lee & Hwang, 2013), elementos característicos de aguas residuales domésticas, se han realizado investigaciones que han demostrado la eficiencia de *Chlorella sp.*, en el tratamiento de este tipo de aguas residuales, logrando tasas de remoción de nutrientes por encima del 80% (Wang *et al.*, 2010) y más del 99% bajo condiciones controladas (Ahmad *et al.*, 2013), con la oportunidad de obtener biomasa con gran potencial de aprovechamiento, entre otros usos, para la producción de metano, biocombustibles, suplementos alimentarios para animales y acuicultura, y en la producción de químicos (Abdel-Raouf *et al.*, 2012).

Ahora bien, en Colombia, la Red de Vigilancia para la Conservación y Protección de las Aguas Marinas y Costeras (2010), expresa la gran problemática ambiental de los ríos y zonas costeras, a causa de los altos aportes de sedimentos y nutrientes (nitrógeno y fósforo) presentes en los ríos y el mar, lo cual implica un riesgo de eutrofización y atenta contra la existencia de los ecosistemas costeros que “son el efecto del vertimiento de aguas residuales y del escurrimiento de amplias áreas agrícolas”.

En articulación con el Plan Nacional de Bioprospección continental y marina (Melgarejo, *et al.*, 2002), el uso de *Chlorella sp.*, como un recurso biológico autóctono puede representar un papel alternativo en el diseño e implementación de procesos tecnológicos ajustados a sistemas de tratamiento convencionales de aguas residuales con el agregado de obtener biomasa rica en metabolitos de valor comercial para los sectores industriales, farmacéutico, cosmético, alimentario y otros dentro del marco de la sostenibilidad.

6.3. Comparación en la concentración de fosfato removida en el agua residual doméstica en función de los parámetros de crecimiento de *Chlorella sp.*

La figura 18, recopila los porcentajes de remoción de fosfato alcanzados en el Tratamiento ARF + MA y el control. En ésta es posible observar que el Tratamiento ARF + MA presenta el mayor porcentaje de remoción, durante la fase exponencial –día 11- con 67% de remoción de fosfato, aproximadamente. Para el caso del Control, los valores son menores que los del Tratamiento ARF + MA, situándose en 56%, aproximadamente, al día 13 del experimento.

Las barras blancas representan los valores negativos de remoción de fosfato en el control, lo que indica que durante los días 2 y 3 se presentó un aumento de la concentración de fosfato en este tratamiento, atribuido a la dinámica propia del agua residual.

Por su parte, la tabla 4, concentra las MDC de *Chlorella sp.*, durante las fases de crecimiento como también los valores promedios de la concentración del ion PO_4^{3-} del Tratamiento ARF + Microalga y el control (ARF). Como se puede observar, durante la fase exponencial, el Tratamiento ARF + Microalga presentan las menores concentraciones del ion PO_4^{3-} , lo que coincide con una alta densidad celular de *Chlorella sp.*

Como ya se ha comentado, las microalgas remueven los nutrientes de las aguas residuales domésticas, por su capacidad de utilizarlos como fuente de alimentación para su crecimiento. Tal es el caso de *Chlorella sorokiniana* y *Desmodesmus communis* que, según investigación realizada por Yao, Shi & Miao (2015), alcanzaron porcentajes de remoción mayores al 99,5% del fósforo total, utilizando mezclas de aguas residuales porcinas, aguas municipales provenientes del tratamiento secundario y dióxido de carbono, como medios de cultivo de estas microalgas con el

objetivo de evaluar sus parámetros de cultivo y capacidad de remoción de nutrientes, durante diez días.

En otro estudio, realizado por Jalal, *et al.*, (2011), cuyo objetivo principal era evaluar, durante siete días, la remoción de fosfato y nitrato de tres especies de microalgas: *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis* y *Scenedesmus quadricauda*, utilizando agua residual municipal como medio de cultivo, las cuales alcanzaron porcentajes de remoción de fosfato de 57,7%, 41,8% y 25,6%, respectivamente, al sexto día del experimento.

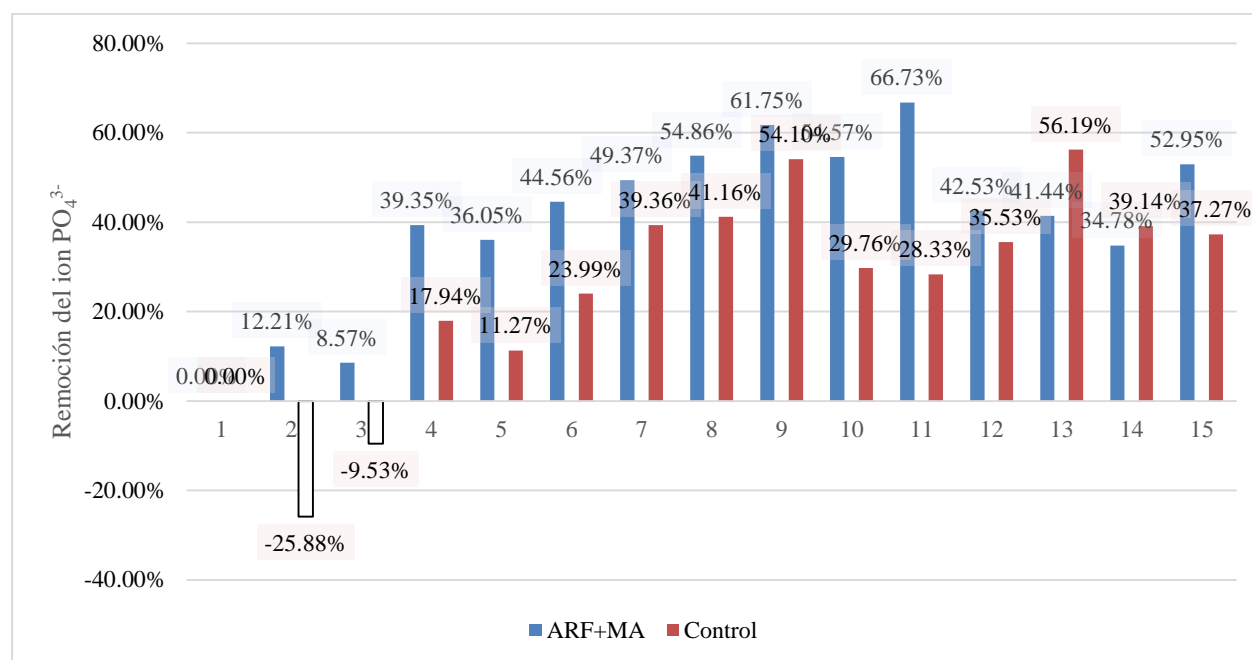


Figura 18. Comparación de porcentajes de remoción del ion PO_4^{3-} en el Tratamiento de ARF + Microalga y el control, en función del tiempo.

Fuente: Autores.

Tratamientos	Concentración Inicial	Fase Inicial		Fase Exponencial		Fase Estacionaria	
	PO_4^{3-} (mg/L)	MDC (10^6 cel.ml $^{-1}$) \pm SD	PO_4^{3-} (mg/L)	MDC (10^6 cel.ml $^{-1}$) \pm SD	PO_4^{3-} (mg/L)	MDC (10^6 cel.ml $^{-1}$) \pm SD	PO_4^{3-} (mg/L)
ARF + Microalga	57,6 \pm 1,8	0,6 \pm 0,2	36,8 \pm 1,3	6,9 \pm 1,1	17,2 \pm 1,3	7,4 \pm 0,7	27,1 \pm 1,1
Control	47,9 \pm 0	NA	42,5 \pm 1,7	NA	22,0 \pm 1	NA	30,1 \pm 0,6

Tabla 4. Concentraciones del ion PO_4 en relación a las MDC de *Chlorella* sp., durante las fases de crecimiento.

Fuente: Autores.

7. Conclusión y Recomendaciones

7.1. Conclusión

- Con respecto al medio de cultivo utilizado, desde los preliminares se evidenció que *Chlorella sp* responde favorablemente a las condiciones que provee el Agua Residual Filtrada, alcanzando tiempos de duplicación menores, $2,4 \pm 0,4$ y $2,6 \pm 0,1$ (días), en su etapa de crecimiento a los 8 y 14 días, respectivamente, en comparación a los que presentó en el medio enriquecido (BBM), $4 \pm 0,9$ y $4,5 \pm 0,7$ días, durante el mismo tiempo transcurrido. De esta manera, se considera que a pesar de la competencia debido a la presencia de otros microorganismos y la adaptación al medio, el agua residual doméstica ofrece los nutrientes necesarios para promover el desarrollo de la población. Al contrario, esterilizar el agua residual puede resultar contraproducente para la disponibilidad de nutrientes, reflejándose en tiempos de duplicación más largos, $3,8 \pm 1,2$ y $7,4 \pm 0,6$ (días), para el cultivo en Agua Residual Estéril.
- Los parámetros de crecimiento de *Chlorella sp* escogidos como variables de respuesta en relación al medio de cultivo, demostraron ir acorde al comportamiento esperado de este microorganismo. En el caso de la Clorofila Total y la densidad celular, $3137,89 \mu\text{g/mL}$ y $0,6 \pm 0,2 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ durante la fase logarítmica o de adaptación, respectivamente, la Clorofila presentó su mayor concentración en la fase exponencial, $6723,71 \mu\text{g/mL}$, coincidiendo con una cresta en el aumento de la densidad celular $6,9 \pm 1,1 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$.

De igual manera, el pH sufrió un incremento significativo hacia el día ocho (8), coincidiendo también con la fase exponencial de la población.

- Mediante el uso de un cultivo de *Chlorella sp* se obtuvo la disminución de los niveles de concentración del ion fosfato (PO_4^{3-}) en Agua Residual Filtrada, pasando de unos $57,6 \pm 1,8$ mg/L al inicio del ensayo, hasta $17,2 \pm 1,3$ mg/L en la fase exponencial, con un porcentaje de remoción de hasta el 61%. Siendo así, se evidenció que *Chlorella sp* tiene el potencial para remover el fosfato de las aguas residuales domésticas.
- Con respecto a los parámetros de crecimiento, se demostró que la concentración de fosfato (PO_4^{3-}) removida por *Chlorella sp* tiene una relación significativa, con $p\text{-valor}=0,0055$ y $R^2=43.4564\%$, e inversa, con la producción de Clorofila Total, es decir, a medida que los niveles de fosfato disminuyeron, los niveles de clorofila se incrementaron. También durante la fase exponencial se presentó la mayor remoción de fosfato, es decir, se presentaron las menores concentraciones del ión PO_4^{3-} cuando la densidad celular de *Chlorella sp* alcanzó altos valores. Esto es coherente si se tiene en cuenta que a medida que el número de individuos aumenta, por sus características fisiológicas también lo hará la síntesis de clorofila, utilizando los nutrientes del medio y en consecuencia disminuyendo el fosfato disponible en el mismo.
- Frente a los tratamientos convencionales implementados generalmente por Empresas Prestadoras de Servicios Públicos, el uso de *Chlorella sp* representa potencialmente, una alternativa tecnológica e innovadora para la remoción de fosfato en aguas residuales

domésticas teniendo en cuenta el comportamiento exhibido frente a las condiciones de cultivo, en las que el medio fue precisamente agua residual doméstica tomada de un escenario real, y los resultados obtenidos en cuanto a la disminución de las concentraciones de fosfato en el mismo medio.

7.2. Recomendaciones

Conociendo el potencial que *Chlorella sp* tiene en la remoción de fosfato y la correlación que existe con los parámetros de crecimiento y además teniendo en cuenta que distintos autores emplean en el desarrollo de sus ensayos, diferentes concentraciones celulares para el inóculo primario, obteniendo a su vez, diferente eficiencia de acuerdo al objetivo de su investigación; y aclarando de antemano que el énfasis del presente proyecto se centra en el fosfato como factor determinante en el fenómeno de la eutrofización de cuerpos de agua dulce, se plantean a continuación una serie de recomendaciones que tendrán su utilidad para ir ajustando al detalle los rangos bajo los cuales sea posible obtener mayor eficiencia en la remoción de contaminantes, de tal manera que a futuro sean aplicables en el diseño de tecnologías para la depuración de aguas residuales; teniendo en cuenta el potencial del uso de la biomasa, y su calidad, en los diferentes sectores de la industria.

- Establecer un diseño experimental que permita elucidar los parámetros de cultivo de *Chlorella sp* como estrategia sostenible para el tratamiento de aguas residuales, teniendo en cuenta diferentes tamaños de inóculo, tipo de sustratos y tiempos de duración.

- Probar la capacidad de depuración de aguas residuales por microalgas aisladas de ambientes acuáticos eutrofizados del departamento del Atlántico.
- Establecer un diseño experimental que permita esclarecer los parámetros de crecimiento de *Chlorella* sp. en relación a las condiciones fisicoquímicas del agua residual -*turbiedad*, *pH*, *solidos disueltos*, *DBO*, *DQO*-.
- Determinar la capacidad de depuración de aguas residuales por *Chlorella* sp. con base a otros tipos de sistemas de cultivo -*fotobiorreactores o miniraceway*- a escala outdoor.

8. Bibliografía

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C. & Torres, E. (1995). Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. A Coruña, España: Universidade da Coruña. ISBN: 84-88301-84-7.
- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. & Ibraheem, I.B.M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257–275.
- Abella, J. & Martínez, M. (2012). Contribución de un afluente tributario a la eutrofización del Lago de Tota (Boyacá, Colombia). *Revista Colombiana de Química*, Julio-Diciembre, 243-261.
- Aertebjerg, G., Carstensen, J.M Hansen, J., Nygaard, K., Rtg, B., Sorensen, K., Severinsen, G., Casartelli, S., Schrimpf, W., Schiller, C. & Druon, J.N. (2001). Eutrophication in Europe's coastal waters, Topic Report 7/2001, EEA, Copenhagen.
- Ahmad, F., Khan, A. & Yasar, A. (2013). The potential of *Chlorella vulgaris* for wastewater treatment and biodiesel production. *Pakistan Journal of Botany*, 45(S1), 461-465.
- Bernal, D., Cardona, D., Galvis, A., & Peña, M. (2008). Guía de selección de tecnología para el tratamiento de aguas residuales domésticas por métodos naturales. *Seminario Internacional sobre métodos naturales para el Tratamiento de Aguas Residuales*. CINARA, Universidad

del Valle. Cali, Colombia. Recuperado de <http://www.ingenieroambiental.com/4014/berna.pdf> en Febrero 28/2015.

Biocyclopedia.com. (s.f.). Bold Basal Medium Composition. Recuperado de http://www.eplantscience.com/index/algae/algal_culturing/bold_basal_medium_composition.php en Septiembre, 27 de 2016.

Björklund, G., Burke, J., Foster, S., Rast, W., Vallée, D. & van der Hoek, W. (2009). Impacts of water use on water systems and the environment. *Water in a Changing World*. Recuperado de http://webworld.unesco.org/water/wwap/wwdr/wwdr3/pdf/19_WWDR3_ch_8.pdf

Camargo, J. A. & Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, implicaciones del cambio climático. *Revista Ecosistemas*, 16(2), 98-110.

Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I. & Morales, E. (2004). Uso de *Chlorella sp.*, y *Scenedesmus sp.*, en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Resolution. J. Plant. Physiol*, 144, 307-313.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306.

Cohen, Z. (1986). Products from microalgae. En Richmod, A. (Ed.) *Handbook of Microalgal Mass Culture* (pp. 421-454). Boca Raton, U.S.A.: CRC Press Inc.

- Connon, R. (2007). Culturing of *Chlorella vulgaris* - Standard Operating Procedure. Recuperado de https://www.reading.ac.uk/web/FILES/biosci/Culturing_Chlorella_156KB.pdf en Septiembre, 27 de 2016.
- Cristancho, Y. & Lagos, D. (2011). *Productividad de pigmentos de valor agregado en Chlorella vulgaris UTEX 1803 utilizando como medio de cultivo diferentes fuentes de Carbono orgánico*. (Tesis de Pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- de-Bashan, L. & Bashan, Y. (2003). Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2, 85-90.
- Durán de Bazúa, C. (1994). *Tratamiento biológico de aguas residuales de la industria de proceso*. México, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- El-Bahbohy, R., Shokry, F., Mottaleb, S., Darwish, E., Safwat, G. & Elghamrawy, N. (2016). *International Journal of Agricultural Science and Research*, 6(3), 513-524.
- Fontúrbel Rada, F. (2005). Indicadores fisicoquímicos y biológicos del proceso de eutrofización del Lago Titikaka (Bolivia). *Ecología aplicada*, 4(1-2), 135-141.

- Fu-Ying, F., Wen, Y., Gui-Zhen, J., Yi-Nong, X. & Ting-Yun, K. (2005). Enhancement of fatty acid production of *Chorella* sp. (chloropyceae) by addition of glucose and sodium thiosulphate to culture medium. *Process Biochemistry*, 40(3-4), 1315-1318.
- Garza, M.T., Almaguer, V., Rivera, J. & Loredó, J. (2010). Bioingeniería aplicada a una columna empacada con *Chorella* sp., inmovilizada para la remoción de metales pesados. *Ciencia UNAL*, 13(2), 174-177.
- González, L., Cañizares, R. & Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*, 60(3), 259-262. doi: 10.1016/S0960-8524(97)00029-1.
- Guillard R, R.L. (1973). Division rates. En: Stein, J.R. (Ed.), *Handbook of Phycological Methods - Culture Methods and Growth Measurements* (pp. 289-313). Londres, Reino Unido: Cambridge Univ. Press
- He, P.J., Mao, B., Lü, F., Shao, L.M., Lee, D.J., & Chang, J.S. (2013). The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters. *Bioresource technology*, 146, 562-568.

- Hernández, J., de-Bashan, L. & Bashan, Y. (2006). Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 190-198.
- Hsin-Hui, W., Sue-Huai, G., Ming-Guo, L., Yi-Ju, C. & Chang-Jung, S. (2015). Effects of *Chlorella* sp. on nutrient treatment in cultures with different carbon to nitrogen ratios. *Water Science & Technology*, 71(11), 1597-1603. Academic Search Complete, EBSCOhost (Consultado el 4 de Enero, 2016).
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Flórez, J., Barrios, F. & Zapata, C. (2012). Propagación de la microalga *Chlorella* sp., en cultivo por lote: Cinética del crecimiento celular. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 159-164.
- Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives De Andréis (INVEMAR). (2010). *Red de Vigilancia para la Conservación y Protección de las Aguas Marinas y Costeras*. Recuperado de http://www.invemar.org.co/documents/10182/14479/INFORME_REDCAM_2010.pdf en Septiembre, 27 de 2016.
- Jalal, K.C.A., Md, Z.A., Matin, W.A., Kamaruzzaman, B.Y., Akbar, J. & Toffazel, H. (2011). Removal of nitrate and phosphate from municipal wastewater sludge by *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis* and *Scenedesmus quadricauda*. *IJUM Engineering Journal*, 12(4), 125-132.

- Jeffrey, S. & Humphrey, G. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 167, 191-194.
- Kim, S. Lee Y. & Hwang, S. (2013). Removal of nitrogen and phosphorus by *Chlorella sorokiniana* cultured heterotrophically in ammonia and nitrate. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 511-516. doi: 10.1016/j.ibiod.2013.05.025
- Komolafe, O., Velásquez, S., Monje-Ramírez, I., Yáñez, I., Harvey, A. & Orta M. (2014). Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. *Bioresource technology*, 154, 297–304. doi: 10.1016/j.biortech.2013.12.048.
- Melgarejo, L.M., Sánchez, J., Reyes, C., Newmark, F. & Santos-Acevedo, M. (2002). *Plan Nacional en bioprospección continental y marina (propuesta técnica)*. Bogotá: Cargraphics. (Serie de Documentos Generales INVEMAR No.11).
- Mora, R., Moronta, R., Ortega, J. & Morales, E. (2005). Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella sp.*, aislada de la Represa de Tulé, Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela. *Revista Ciencia*, 12(2), 1-9.
- Moreno, A. R. (2013). *Estudio de diferentes bioadsorbentes como posibles retenedores de fosfatos en aguas* (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

- Moronta, R., Mora, R., & Morales, E. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23(1), 28-43.
- Muñoz-Peñuela, M., Ramírez-Merlano, J.A., Otero-Paternina, A.M., Medina-Robles V.M., Cruz-Casallas, P.E. & Velasco-Santamaría, Y.M. (2012). Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y el contenido proteico de *Chlorella vulgaris*. *Rev Colomb Cienc Pecua*, 25(3), 438-449.
- Oh-Hama, T. & Miyachi, S. (1998). *Chlorella*. En Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (Eds.) *Microalgal Biotechnology* (pp. 3-26). Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- Parry, R. (1998). Agricultural phosphorus and water quality: A US Environmental Protection Agency perspective. *Journal of Environmental*, 27(2), 258-261.
- Peña, E.J., Palacios, M.L., & Ospina, N. (2005). *Algas como indicadores de contaminación*. Santiago de Cali, Colombia: Universidad del Valle, Programa Editorial.
- Pirt, M. & Pirt, S. (1977). Photosynthetic production of biomass starch by *Chlorella* in a chemostat culture. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*, 27(6), 643-650. doi: 10.1002/jctb.5020270604

Resolución 427 de 2009. Diario Oficial No. 47.285, Colombia, 8 de marzo de 2009.

Romero-Aguilar, M., Colin-Cruz, A., Sánchez-Salinas, E., & Ortiz-Hernández, M. L. (2009).

Wastewater treatment by an artificial wetlands pilot charge removal. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25(3), 157-167.

Romero, T., Miyashita, H. & Kurano, N. (2000). *Boletín del centro de investigaciones biológicas*, 34(2), 93-10.

Ruíz-Martínez, A., García, N. M., Romero, I., Seco, A., & Ferrer, J. (2012). Microalgae cultivation in wastewater: nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresource technology*, 126, 247-253.

Sharifah, E.N., & Eguchi, M. (2012). Benefits of live phytoplankton, *Chlorella vulgaris*, as a biocontrol agent against fish pathogen vibrio anguillarum. *Fisheries Science*, 78(2), 367-373.

Sokolnikov, M. (1999). *Causes and effects of eutrophication in the Black Sea. Danube Pollution Reduction Programme*. Summary report. Programme UNDP/GEF Assistance. Vienna, 13-17.

Tecnoplades. (2013). *Protocolo de microalgas*. Manzanillo, Colima: Agencia de desarrollos Tecnoplades.

Teixeira Correia, G., Sánchez Ortiz, I. A., Gebara, D., Dall'Aglio Sobrinho, M., & Matsumoto, T. (2013). Remoción de fósforo de diferentes aguas residuales en reactores aerobios de lecho fluidizado trifásico con circulación interna. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (67), 172-182.

Triple A. (s.f.). Estructura EDAR El Pueblo. Recuperado de http://www.aaa.com.co/wordpress/wp-content/uploads/2016/02/al_edar.pdf en Octubre, 10 de 2016.

Torrentera, L. & Tacon, A. (1989). *La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. Una diagnosis*. Italia: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Vera, A., Martínez, M., Morillo, K., & Montes, S. (2004). Cultivo discontinuo de *Chlorella sp.*, en medios enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia macracantha*. *Bol. Centro Inv. Biol.*, 38, 109-119.

Von Sperling, M.V. (2012). *Introducción a la calidad del agua y al tratamiento de aguas residuales*. San Juan de Pasto, Colombia: Ed. Universitaria Universidad de Nariño Principios Aguas Residuales.

- _____, E., da Silva Ferreira, A. C., & Gomes, L. N. L. (2008). Comparative eutrophication development in two Brazilian water supply reservoirs concentrations and bacteria growth. *Desalination*, 226(1), 169-174.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y. & Ruan, R. (2010). Cultivation of green algae *Chlorella sp.* in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), doi: 10.1007/s12010-009-8866-7
- Wang, S., Poon, K. & Cai, Z. (2013). Biodegradation and removal of 3,4-dichloroaniline by *Chlorella pyrenoidosa* based on liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(1), 552-557. doi: 10.1007/s11356-012-0995-9.
- Wang, Y., Li, J., Zhai, S., Wei, Z. & Feng, J. (2015). Enhanced phosphorus removal by microbial-collaborating sponge iron. *Water Science y Technology*, 72(8), 1257-1265. Academic Search Complete, EBSCOhost (Consultado el 6 de Enero de 2016).
- Wegmann, K. & Metzner, H. (1971). Synchronization of *Dunaliella* cultures. *Archiv für Mikrobiologie*, 78(1), 360-367. doi: 10.1007/BF00412276
- World Water Assessment Programme. (2009). The United Nations World Water Development Report 3: Water in a Changing World. Paris: UNESCO Publishing, and London: Earthscan

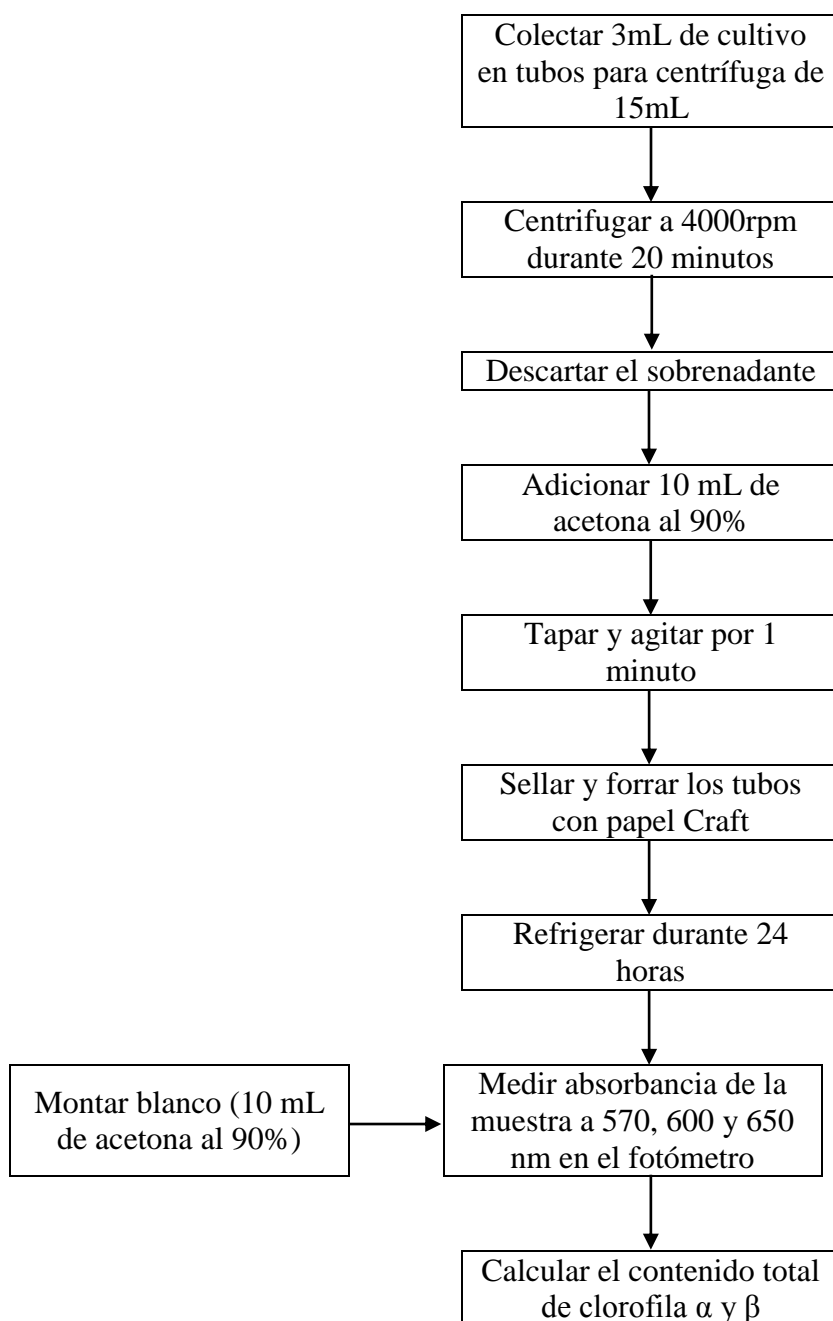
Ya'e, W., Li, J., Zhai, S., Wei, Z. & Feng, J. (2015). Enhanced phosphorus removal by microbial-collaborating sponge iron. *Water Science & Technology*, 72(8), 1257-1265. Academic Search Complete, EBSCOhost (Consultado el 6 de Enero, 2016).

Yao, L., Shi, J. & Miao, X. (2015). Mixed wastewater coupled with CO₂ for microalgae culturing and nutrient removal. *Plos One*, 10(9), 1-19. doi: 10.1371/journal.pone.0139117

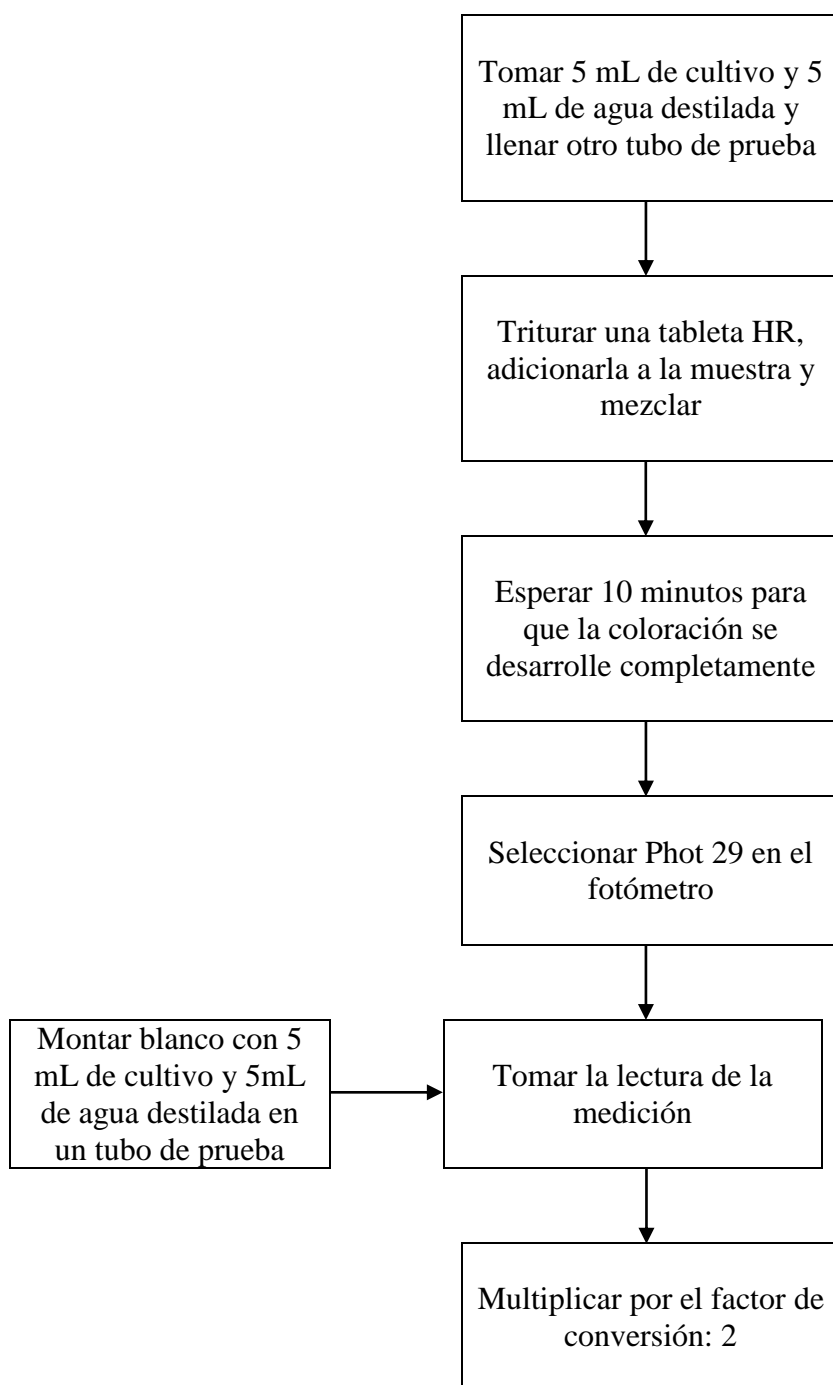
Anexos

Anexo 1. Esquema general del proceso metodológico del proyecto



Anexo 2. Marcha analítica para la determinación de pigmentos cloroplásticos.

Fuente: Autores.

Anexo 3. Marcha analítica para la determinación de las concentraciones de fosfato (PO_4).

Fuente: Autores.

Anexo 4. ANOVA CLOROFILA TOTAL vs FOSFATO

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1,92231E7	1	1,92231E7	10,76	0,0055
Residuo	2,50123E7	14	1,78659E6		
Total (Corr.)	4,42354E7	15			

Coefficiente de Correlación = -0,659214

R-cuadrada = 43,4564 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 39,4175 por ciento